



16
2 ej
Universidad Nacional Autónoma de México

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

**DETECCION DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida
Y LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL
ESTABLECIMIENTO DE CANDIDOSIS INTESTINAL EN
PACIENTES CON SINDROME DIARREICO**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

GUTIERREZ CASTAÑEDA BENITO

Director de Tesis: M. C. JOSEFINA TORRES GOMEZ
**Lugar de Adscripción: Laboratorio de Microbiología y Parasitología,
E. N. E. P. Iztacala, U. N. A. M.**
Asesor Interno: M. en C. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

MEXICO, D. F.

1990





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E :

Contenido	Paginas
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION	2
III.- ANTECEDENTES	5
IV.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	14
V.- METODO	15
VI.- RESULTADOS	17
VII.- DISCUSION	19
VIII.- CONCLUSIONES	24
IX.- BIBLIOGRAFIA	25
X.- APENDICE	29

RESUMEN

En la naturaleza se puede encontrar una gama innumerable de organismos que poseen características propias que definen su actividad específica dentro de un hábitat determinado. Los hongos son los seres vivos encargados de realizar procesos de reciclaje de material orgánico una vez que este ha sido desechado por la gran mayoría de los integrantes de la biosfera. Por esta razón es que se justifica su distribución cosmopolita.

Dentro de este grupo se pueden encontrar ciertas especies que tienen la capacidad de producir infecciones al hombre y otros animales. Las levaduras del género Candida se incluyen dentro de esta clasificación. Estas se pueden encontrar en varios sitios de la anatomía humana, principalmente en la luz del tracto digestivo, entre otros. Generalmente, estas poblaciones conviven con el organismo hospedero en fase saprobia, mas si esta prolifera de manera descontrolada como consecuencia de una mala respuesta del sistema inmune, de desórdenes metabólicos internos del mismo hospedero o por causas iatrogénicas, las levaduras se transforman en parásitos propiciando infecciones denominadas genéricamente candidosis. La candidosis intestinal, por ser, no ha sido muy estudiada en parte por desconocimiento y en parte por la dificultad de establecer un diagnóstico efectivo al respecto.

Este estudio se desarrolló para determinar el comportamiento de estos organismos en una porción de la población Mexicana, para esto se colectaron un total de 365 muestras de heces fecales, a las cuales se les aplicaron las técnicas clínicas coprocultivo, coproparasitoscópico, frotis directo con tinción de Gram y subcultivo en agar Nickerson, del cual se obtuvieron levaduras, a las que se les determinó la especie por medio de ensayos de fermentación, producción de clamidosporas y tubo germinativo. Al término del mismo se observó que las levaduras del género Candida son las que se encuentran con mayor frecuencia en los aislamientos intestinales con 739 cepas. La candidosis intestinal pudo determinarse en el 17% de los casos analizados, donde C. albicans presento la mayor distribución dentro de la población estudiada, los factores predisponentes a la infección mas comunes fueron: en niños la anemia, y en adultos la medicación. Finalmente se comprobó estadísticamente que el conteo de más de 100 colonias de Candida por placa de agar Nickerson puede considerarse como un factor auxiliar en el diagnóstico de candidosis intestinal en casos de pacientes con síndrome diarreico crónico o rebelde a tratamiento.

INTRODUCCION

Los hongos han convivido con el hombre desde siempre y su relación ha influido en gran medida al desarrollo de las civilizaciones antiguas y modernas, tanto directa como indirectamente e incluso sin tener plena conciencia de ello. Esta relación ha tenido y propiciado vínculos míticos, religiosos y sociales. Por esta razón en nuestros días estos organismos son ampliamente conocidos, aunque sea en su contexto más general (1).

De acuerdo a su concepción biológica, son éstos los poseedores de un papel ecológico primordial. English (19) menciona que debido esencialmente a su condición saprófita, son ellos los principales responsables de completar algunos de los ciclos biogeoquímicos presentes en la naturaleza, reduciendo aquéllos compuestos orgánicos de origen animal y vegetal a moléculas de carácter inorgánico con el fin de facilitar su asimilación por otros organismos y reintegrarlos a la biosfera mediante un proceso que de forma común es llamado descomposición. Sin embargo, los hongos con base en sus propiedades han sido bien utilizados por el hombre; sus beneficios, como lo señala Alexopoulos (1), se generan principalmente dentro de la industria alimenticia y de fermentación, en esta última, las principales responsables son las denominadas "levaduras". De éstas no todas proveen algún beneficio y no por eso dejan de tener importancia, tal es el caso de aquellas pertenecientes al género Candida.

Estos organismos son capaces de convivir dentro del cuerpo humano alimentándose de los productos no asimilados por éste sin ocasionarle daño alguno, salvo bajo ciertas condiciones en las que el comportamiento común se altera transformándose entonces en un parásito del mismo hospedero, propiciándose así la enfermedad llamada Candidiasis o Candidosis, la cual se puede manifestar como infecciones micóticas que pueden ser agudas o crónicas, superficiales, internas, localizadas o diseminadas. En la actualidad se han logrado reconocer, según el orden de frecuencia expuesto por Odds (37), los siguientes tipos de candidosis :

1. Orofaringea,
2. Vulvovaginal,
3. Cutánea,
4. Mucocutánea,
5. Sistémica,
6. Gastrointestinal,
7. Del Tracto Respiratorio,
8. Del Tracto Urinario,
9. Endocrática,
10. Oftálmica,
11. Del Sistema Nervioso Central, y
12. En Hueso.

Rose (43) menciona que al menos existen siete especies de Candida asociadas a manifestaciones patógenas en el hombre,

siendo las más comunes y por lo mismo las más patógenas C. albicans, C. tropicalis y C. stellatoidea. Barnett (5) señala a tales organismos como levaduras filamentosas debido al hecho de presentar características levaduriformes cuando el hospedero está sano. En cambio, Thorn, et al (52) menciona que, bajo ciertas circunstancias en las que la capacidad inmune del individuo hospedero se ve reducida, se pueden encontrar estructuras filamentosas en tejido infectado, que de acuerdo a English (19) se trata de un pseudomicelio, confirmándose de esta manera la candidosis, que como se mencionó antes puede afectar desde la primera capa epidérmica, intersticios corporales, tracto gastrointestinal, conductos sexuales, pulmones e inclusive el torrente sanguíneo, con lo que se puede considerar de potencialidad fatal en algunos de estos casos dependiendo de la severidad de la infección (57).

Las levaduras del género Candida al igual que la mayoría de los hongos considerados patógenos no necesitan para sobrevivir de una elevada capacidad infectiva, ya que sus infecciones son causadas por fenómenos meramente circunstanciales (13). En cambio muchos hongos considerados desde mucho tiempo antes como saprobios comunes están hoy implicados como patógenos humanos frecuentes debido a las técnicas médicas actuales que pueden transformar a los pacientes en individuos susceptibles de infección siendo un caso típico la candidosis en todas sus formas.

La importancia de estos organismos como patógenos radica en su alta incidencia como comensal normal y su rapidez de dispersión dentro del organismo, así como el hecho de presentar una distribución cosmopolita (43). Como se mencionó anteriormente existen ciertos factores que facilitan el establecimiento de tales poblaciones en fase infectiva en el organismo. Sheklakov (49) las clasifica en dos categorías, basándose en el efecto que ocasionan al hospedero, pudiendo ser exógenos o endógenos, siendo ejemplos de los primeros los traumatismos, humedad, la acción de ácidos o alcalis en la piel, así como la patogenicidad del hongo. Los factores internos pueden ser la edad, que ocasiona una capacidad inmune inadecuada, infecciones generales, desórdenes metabólicos, desnutrición, neoplasias y el uso de drogas inmunosupresoras (19,43 y 49).

A pesar del conocimiento generado al respecto de las formas de infección del hongo, así como de los factores que la propician, English (19) reconoce que los métodos actuales de diagnóstico en laboratorio para candidosis intestinal resultan muy complicados y a menudo confusos. Por su parte Sheklakov (49) sostiene que "... el carácter micótico de la enterocolitis y otros padecimientos comunes semejantes no difieren entre ellos de manera apreciable en el aspecto clínico".

Finalmente es importante el mencionar que la candidosis es considerada como un grave problema de salud pública, y sobretodo si la capacidad inmune de un individuo cualquiera no se encuentra

del todo maduro, como lo es el caso de los niños lactantes, o presenta alguna deficiencia, además de la escasa información a nivel mundial de la que se puede disponer de este tema en particular, por lo que el presente estudio pretende ser el primero de su tipo en México, que establezca su comportamiento en esta población en particular y uno de los primeros a nivel mundial en el que se determine la participación de Candida en el síndrome diarreico, ya que en la actualidad a ésta enfermedad, por lo mismo de su desconocimiento, aún no se le da la importancia real debido a la falta de estudios que puedan aclarar y facilitar su diagnóstico temprano y de a conocer las graves consecuencias que pueda provocar un tratamiento equivocado o deficiente.

ANTECEDENTES

Hace más de tres milenios, según la leyenda griega, Perseo fundó la ciudad de Micenas en agradecimiento a una seta (mykes) de la que hizo fluir agua con la que satisfizo su sed, recibiendo así tal nombre. De la misma raíz griega, la Micología (Gr. mykes = seta + logos = estudio) es el estudio de las setas. La micología, o más correctamente la micetología de acuerdo a la gramática griega, comenzó como ciencia mucho tiempo atrás ya que las setas son de los hongos más grandes, atrayendo por lo mismo la atención de los naturalistas. Con la invención del microscopio en el siglo XVII comenzó el estudio sistemático de los mismos, considerándose al botánico Pier Antonio Micheli como el padre de la micología por su publicación "Nova Plantarum Genera" de 1729 donde incluyó sus investigaciones sobre hongos (1).

En la actualidad, el término hongo (L. fungus = seta, del Gr. sphongos = esponja) se usa para designar a organismos eucarióticos, portadores de esporas, aclorofílicos, que por lo general se reproducen sexual y asexualmente y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina, celulosa o ambas sustancias junto con muchas otras moléculas orgánicas complejas (1).

Aunque el estudio sistemático de los hongos solo tiene 260 años, las manifestaciones de este grupo de organismos han sido conocidas durante milenios. Los pueblos antiguos eran conocedores de la fermentación biológica y la consideraban como un don divino atribuyendo así mismo la aparición de ciertas setas como el resultado de fenómenos meteorológicos inexplicables para ellos. De una forma específica, los hongos son los agentes causantes de gran parte de la desintegración de la materia orgánica y como tales nos afectan diariamente, destruyendo todos aquellos bienes de consumo fabricados o manufacturados a partir de materias primas expuestas a su ataque. Causan la mayoría de las enfermedades conocidas de las plantas y muchas de las enfermedades de los animales y, entre ellos, de los seres humanos; constituyen la base de varios procesos industriales en los que intervienen la fermentación como la elaboración del pan, vinos, cervezas, la fermentación del cacao y la elaboración de ciertos quesos; son empleados en la producción comercial de muchos ácidos orgánicos, de algunas drogas, como la ergometrina y cortisona y de algunos preparados de vitaminas y son responsables de la fabricación de varios antibióticos, principalmente la penicilina y la griseofulvina (1).

Los hongos son a la vez destructivos y genéticos para la agricultura. Por una parte, son responsables de los daños que afectan a las cosechas a través de las enfermedades que provocan a las plantas, aunque en su papel de saprofitos, los hongos junto

con las bacterias, se han ocupado a lo largo de millones de años, del reciclaje de muchos elementos químicos que sin su actividad habrían quedado bloqueados en las plantas o en el cuerpo de los animales muertos. Muchos hongos son particularmente importantes por su actividad en la descomposición de los restos vegetales, debido a su capacidad para utilizar la celulosa. De esta manera, los nutrientes de las plantas pasan al suelo de una forma disponible para los vegetales en crecimiento y se libera bióxido de carbono a la atmósfera para ser usado en la fotosíntesis. Finalmente, también han sido cultivadas algunas setas comestibles como el champiñón, Agaricus brunneocens y otros más (1 y 22).

Más recientemente el interés hacia estos organismos se ha reflejado en otros campos de la biología por su utilidad en la investigación de procesos biológicos fundamentales, además de las ventajas de cultivo, mantenimiento, disponibilidad de espacio y facilidad de manejo en comparación con la mayoría de los animales y plantas.

Los hongos difieren principalmente de las bacterias por el hecho de ser organismos eucarióticos. Se parecen a las plantas sencillas dado que, con pocas excepciones, poseen paredes celulares definidas, pero contrastan fundamentalmente de ellas en que no tienen clorofila y por eso son incapaces de fotosintetizar sus propios carbohidratos. Por lo tanto son, por necesidad, parásitos obligados o saprofitos, y por lo mismo dependientes de materia orgánica viva o muerta para extraer de ella carbohidratos prefabricados. Los hongos, cuando son pluricelulares, no poseen tallos, raíces ni hojas, ni han desarrollado un sistema vascular, como sucede con las plantas (1 y 19).

De acuerdo a English (19), los filamentos que constituyen el cuerpo o soma de un hongo, equivalente al aparato vegetativo en plantas, se encuentran unidas lateralmente en gran número formando el micelio, el cual crece dentro o sobre un sustrato y su función consiste en absorber nutrientes, sostener estructuras reproductivas, las cuales se diferencian a partir de las mismas estructuras somáticas, y en muchas ocasiones proveen de una fase de descanso para ayudar al hongo a sobrevivir durante períodos de condiciones ambientales desfavorables. Las hifas de los hongos más primitivos consisten en tubos continuos sin tabiques (aseptados); si dicho tubo es unicelular y crece por brotes (blastosporas) que quedan fijos a la célula madre se dice que se trata de un pseudomicelio, el cual tiene la característica de ser fácilmente disociable. El micelio cenocítico consiste en una estructura tubular única, ramificada, multinucleada, sin división protoplásmica, salvo aquellas que nacen en la terminación de las hifas fértiles y es propio de los Phycmycetes. En los grupos más evolucionados, las hifas son septadas adquiriendo esta característica cuando el tubo germinativo alcanza cierta longitud (57).

Algunos hongos forman, a expensas de hifas vegetativas, células de resistencia en respuesta a condiciones ambientales

adversas, a partir de las cuales son capaces de procrear nuevos individuos de la misma especie pudiendo ser alguna de las siguientes:

- a) Las artósporas, en donde las hifas pueden escindir de las células que las componen, comportándose entonces como esporas. o
- b) Si las células quedan recubiertas por una pared gruesa antes de que se separen unas de otras o de células hifales colindantes se denominan clamidosporas.

La fragmentación de las estructuras somáticas no únicamente se da por medios naturales, también puede producirse accidentalmente, al desgarrarse partes del micelio debido a fuerzas externas. Incluso este método de fragmentación es ampliamente utilizado en laboratorio para propagar cultivos fúngicos. La fisión celular y la gemación son métodos comunes de propagación de organismos sencillos, como lo son las levaduras, que son hongos verdaderos (1). Sin embargo el método de reproducción asexual más común consiste en la formación de esporas pudiéndose encontrar situadas en esporangios o produciéndose en el ápice o a los lados de hifas, donde se denominan conidios. Las esporas producidas en esporangios pueden ser, en los hongos más sencillos, móviles y provistas de flagelo (zoosporas), o aplanosporas si no son móviles. No obstante lo anterior, las bases de la clasificación para hongos están estructuradas en las características de su reproducción sexual(1).

Los hongos de importancia médica pueden pertenecer a la subdivisiones Zygomycetes, Ascomycetes o Basidiomycetes. En los primeros, la reproducción sexual es por la fusión de los extremos de dos hifas fértiles con la formación de una gran zigospora. En los Ascomycetes una asca contiene 8 ascosporas sexuales producidas por meiosis. Para las últimas 4 basidiosporas se forman en proyecciones en la punta de un basidio claviforme (19).

La mayor parte de los hongos pueden crecer entre 0 y 35 C, pero la temperatura óptima varía de 20 a 30 C. Existen especies termófilas que pueden crecer a una temperatura máxima de 50 C. Así mismo tienen la capacidad de resistir bajas temperaturas en fase de reposo lo que permite el almacenamiento prolongado en nitrógeno líquido a -196 C. A diferencia de las bacterias, los hongos prefieren medios ácidos para su crecimiento siendo un pH de 6 el óptimo aproximado para la mayoría de las especies investigadas. Un punto interesante es que aún cuando la luz no es necesaria para el desarrollo del cuerpo vegetativo, si es esencial para la esporulación en muchas especies (1).

Muchos hongos provocan enfermedades en las plantas, pero solo aproximadamente 100 de las miles de especies, conocidas de levaduras y mohos provocan enfermedades en el hombre o en los animales. Los dermatofitos y Candida son comúnmente transmitidos de un individuo a otro por contacto directo (29).

En general, con la excepción de algunos dermatofitos, los hongos no dependen para sobrevivir de su habilidad para causar infección en el humano. La producción de enfermedades en el hombre por estos organismos es un fenómeno accidental. La patogénesis parece ser una cualidad peculiar de cada organismo particular y como se sabe, una cualidad no está relacionada taxonómicamente con la especie. En la mayoría de los casos es la habilidad para adaptarse y sobrevivir en un ambiente desfavorable lo que diferencia las especies patógenas de las que no lo son. Sin embargo bajo ciertas circunstancias donde las defensas del hospedero en contra de infecciones están alteradas, las especies de hongos usualmente consideradas como no virulentas pueden invadir y producir la enfermedad, y por lo tanto adjudicarle el término patógeno (13).

Como ya se señaló anteriormente son pocos los hongos que implícitamente se reconocen como patógenos humanos y las enfermedades que estos causan, según lo expone English (19), son de menor importancia en cuanto al número, que aquellas causadas por bacterias o virus. Muy pocas especies de hongos son patógenos obligados del hombre, la mayoría tienen una fase sapróbica autosuficiente, con respecto al ciclo vital, en nichos ecológicos distintos y no dependen estrictamente del hospedero para su supervivencia. No obstante muchos hongos considerados desde mucho antes como sapróbios comunes, están hoy implicados como patógenos ocasionales del hombre a consecuencia de nuevas técnicas médicas que transforman al paciente en un individuo susceptible de infección artificialmente.

Antes de profundizar en un estudio de micología médica, se considera esencial el entendimiento de los siguientes términos que son amplia y a menudo indiscriminadamente usados (29):

- Infecciones primarias son enfermedades que ocurren en personas sanas. Algunas de estas micosis incluyen las Dermatophytosis, Mycetomas, Esporotrichosis y Coccidioidomycosis.

- Infecciones secundarias son aquellas que ocurren en un individuo que previamente se encuentra debilitado por alguna condición primaria, usualmente no relacionada. Ejemplos de éstas incluyen todas las enfermedades producidas por patógenos oportunistas como Aspergilosis pulmonar y la mayoría de los casos de Candidosis: la Criptococcosis puede ser una infección primaria o secundaria.

Una persona de salud normal, si está en contacto frecuente con hongos que causan infecciones secundarias, corren el riesgo de contraer la enfermedad debido a que, en el caso de que el hongo penetrara las barreras naturales de la piel, mucosa o tejido muscular sano, puede rápidamente sobrepassar con facilidad los sistemas inmunes normales del cuerpo (49).

Los hongos patógenos oportunistas, son aquellos que no tienen necesariamente una fase patogénica para su propia supervivencia: su ciclo de vida puede completarse y su

perpetuación asegurarse por solamente su fase saoróbica. Pero son capaces de ser patógenos si encuentran un hospedero en una condición receptora disponible. Estrictamente todos los hongos de importancia médica, excepto los dermatofitos, son patógenos oportunistas. Pero algunos, principalmente Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum, se encuentran tan bien adaptados al ciclo patógeno que se omiten de la consideración anterior. Los oportunistas, por tanto, incluyen todos los hongos clasificados como patógenos secundarios, junto con aquéllos que causan las micosis subcutáneas que deben ser introducidas al cuerpo a través de una herida.

Por otra parte, los primeros indicios de los que se tienen referencia en cuanto a la presencia de la candidosis como etiología definida, lo encontramos relatado por Hipócrates aproximadamente 4000 años A.C. donde menciona que algunos recién nacidos tenían la lengua cubierta por una capa blanca, conocida ahora como algodoncillo, y la denominó "Estomatitis aftosa", la cual es ocasionada por levaduras del género Candida que aparte de ésta enfermedad, es el agente causal en muchas otras formas que pueden afectar piel, mucosa, tejido nervioso, tracto respiratorio y gastrointestinal y en algunos casos el sistema circulatorio (19).

Ya en la era cristiana, Galeno nombró a su vez el mismo padecimiento como "Aphthae alba", pero aún no se conocía al organismo causal de la misma: en 1849, Wilkinson realizó la primera descripción clínica de la candidosis vaginal, aunque no con ese nombre, y en 1875 Haussmann demostró que el organismo causal era el mismo en ambos casos (57). Flaut en 1887, aisló un hongo levaduriforme de madera podrida con el que produjo lesiones semejantes a las de candidosis oral en lenguas de ovollo, por lo que consideró que el agente etiológico era el mismo y Zoof, en 1890, nombró al hongo del algodoncillo como Monilia albicans, lo cual impulsó a reconocer esta enfermedad como Moniliasis (37,52).

A principios de este siglo, ya estaba bien establecido de las enfermedades debilitantes predisponían al paciente a contraer este tipo de infecciones. Para 1912 Castellani sugirió que era posible la existencia de otras especies como agentes patógenos de la Moniliasis, y fué el mismo quien dió la primera descripción de lo que hoy conocemos como Candida quillermondii, C. krusei, C. pseudotropicalis y C. tropicalis aunque aun las agrupaba dentro del género Monilia (38).

Esta confusión fué aclarada en 1927 por Berknot quien distinguió a las especies del género Monilia, quienes no desarrollan pseudohifas, además de ser únicamente levaduras saoróbicas vegetales y propuso el nombre genérico de Candida, que es con el que actualmente se reconocen las levaduras de este tipo, las que ahora se localizan dentro de la siguiente clasificación:

DIVISION: Amastigomycota,
SUBDIVISION: Deuteromycotina,

CLASE: Deuteromycetes,
SUBCLASE: Blastomycetidae,
ORDEN: Cryptococcales,
FAMILIA: Cryptococcaceae,
- GENERO: Candida.

El mismo Berkhout, describe las levaduras del género Candida como microorganismos unicelulares que generalmente se encuentra en fase saprobia en animales de sangre caliente, pueden ser ovoides, esféricos o fusiformes en condiciones comensalistas, sin embargo pueden producir hifas septadas bien desarrolladas por brotación lateral o apical en condiciones de cultivo o en su fase patógena; produce conidios esféricos u ovalados, hialinos o rosados ya sea en racimos laterales o solitarios en el ápice del micelio (4).

En nuestros días, es común el encontrar todavía los términos "Monilia y Moniliasis" en textos médicos, que aunque incorrectos aún son utilizados frecuentemente, siendo más apropiados Candidosis o Candidiasis (52 y 49).

Esta enfermedad es una micosis aguda o crónica, superficial o diseminada (40). Rose (43) por lo menos menciona siete especies asociadas a manifestaciones patógenas en el hombre, que aparte de las mencionadas anteriormente son C. albicans, C. stellatoidea y C. parapsilosis. De éstas, la especie que se muestra como el agente etiológico más común, de gran variedad de formas clínicas y por lo mismo la más estudiada dentro del género es Candida albicans quien se puede encontrar comúnmente como comensal en boca, intestinos, vagina y se establece por lo mismo en asociación frecuente con una variedad importante de lesiones superficiales, cutáneas y mucosas, siendo capaz de infectar sitios profundos a nivel visceral, ya sea en órganos individuales o sistémico por medio del torrente sanguíneo, siendo a menudo fatal (49 y 57).

La importancia de este organismo como patógeno deriva de su alta incidencia como comensal y la rapidez en la que puede dispersarse de los sitios en que actúa como comensal cuando la resistencia natural del hospedero hacia infecciones ha sido alterada por factores predisponentes, así como su distribución cosmopolita (40,43,57).

Los factores predisponentes mencionados pueden ser exógenos o endógenos, siendo ejemplos de los primeros, los traumatismos por compresión, humedad elevada, la acción de ácidos o alcalis en la piel, así como la patogenicidad y virulencia del hongo (49). Son éstas también las que determinan el grupo de la población más susceptible a estas enfermedades, así como las medidas profilácticas que se deben aplicar y en donde aplicarse (40).

Los factores internos pueden ser la edad, debida a una capacidad inmune inadecuada, ya sean infantes donde el sistema

inmune es aún inmaduro, o en ancianos donde el organismo presenta un decaimiento general de las funciones metabólicas. Las enfermedades metabólicas y embarazo son también causas que pueden facilitar la infección por Candida debido principalmente a los cambios metabólicos que involucran tales situaciones, es decir, las variaciones en los niveles hormonales influyen sobre la condición total del individuo, por ejemplo en la Diabetes mellitus la falta de la insulina provoca una deficiente capacidad celular generalizada, pues no existe un suministro efectivo de energía (glucosa) hacia el interior de las células incluyendo por supuesto a aquellas encargadas de fagocitar a esta clase de parásito.

La hipo y avitaminosis también pueden influir sobre el desarrollo de la candidosis desde que las vitaminas actúan como reguladores de una gran variedad de enzimas, y por lo mismo la deficiencia en el consumo de las mismas impide el desarrollo normal de los sistemas defensivos, mientras que la alta concentración de algunas enzimas específicas inhiben reacciones internas que regulan la actividad celular en cuanto a la síntesis y expresión de proteínas, incluyendo entre ellas a los anticuerpos que reconocen a las levaduras del género Candida.

En el caso de las neoplasias se ha observado que la presencia de estas estructuras en el organismo, sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad, implica la afectación de algunos órganos encargados en gran medida de la respuesta inmune celular lo que provoca una depresión generalizada de los mecanismos de defensa del individuo. Más recientemente se han encontrado casos de candidiasis ocasionados iatrogénicamente, es decir, que se han generado como respuesta al suministro de medicamentos que deprimen el sistema inmune natural del organismo, en muchos casos este tipo de medicamentos son usados como adyuvantes en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (19, 43 y 49).

Es bien sabido que el género Candida tiene alta incidencia en individuos normales y enfermos, considerándolo como un comensal normal en tracto digestivo humano, piel y vagina (19, 43), por lo tanto, la aparición de Candida en las heces de sujetos normales de todas las edades es elevada y por lo mismo indica que el tracto intestinal es un habitat común para sus especies, aunque únicamente puede asumir su papel patogénico en el caso de que no exista, o sea relativamente baja, la competencia microbiana de la flora normal intestinal o los sistemas inmunes normales se encuentren deprimidos (20,46).

Se ha estudiado el mecanismo de infección de Candida en intestinos en un modelo animal con recién nacidos (10), en la cual se ha comprobado que la candidosis infecciosa se transmite por el conducto orofaríngeo y el esófago. A partir del primer día, según lo describe Bycov, se forman pseudohifas, las cuales proliferan en los días subsiguientes sobre el epitelio, comenzando después la penetración del órgano pasando del tercer

dia y causando daños al tejido muscular, con la posterior invasión al torrente sanguíneo; estas infecciones pueden ser reversibles si el ratón es amantado por su madre, la cual posiblemente le proporciona algunos factores fungicidas presentes en la leche.

La mayoría de los micólogos aceptan la teoría de la Dysbacteriosis, de acuerdo a la cual los hongos levaduriformes del género Candida está en constante antagonismo así como en un equilibrio móvil con los otros constituyentes de la flora microbiana. En la microflora de un individuo sano, los productos residuales de la actividad metabólica de los bacilos y cocos Gram-negativos suprimen la actividad reproductiva de las levaduras. Durante el uso prolongado de grandes dosis de antibióticos de amplio espectro, ya sea en infecciones generales o gastrointestinales, la población de los Gram-negativos se suprime y por lo tanto se crean condiciones favorables para el desarrollo y multiplicación de las levaduras. Aún más, el proceso de Dysbacteriosis provoca la disfunción del intestino y la absorción de los residuos microbianos (toxinas), lo cual agrava la condición del hospedero y favorece el establecimiento de la candidiasis (49).

Cormane (en Rose, 43) sugiere que bajo estas circunstancias la competencia interespecífica entre Candida y algunas bacterias por los carbohidratos disponibles en el tracto intestinal se ve reducida predominando entonces las poblaciones del hongo, promoviendo así su transformación a la fase patógena. Sin embargo, la candidiasis mucocutánea crónica se cree, según English (19), que es el resultado de deficiencias congénitas del sistema inmune, que en este caso se presenta con una severidad tal que es posible la perforación de órganos tales como intestino delgado, colon, y otros, o complicarse en forma de infecciones de úlceras gástricas en un porcentaje de hasta 6.9% (16, 21, 23, 30, 46).

Los métodos de diagnóstico para cualquier forma de candidosis resultan muy complejas, debido a que todas las especies de Candida son consideradas como comensales normales del hombre. Cuando un hongo se aísla de un espécimen patológico, es a menudo muy difícil asegurar si éste se buscaba como patógeno o se trata de un mero contaminante. La microscopía directa de la muestra puede proporcionar información valiosa e indicar que grandes cantidades de micelio en ella puede servir como indicio de patogenicidad, mientras que sólo pequeñas cantidades de la fase levaduriforme mostraría el estado comensalista del hongo (19).

Sheklakov (49) por su parte asevera que el carácter micótico de la enterocolitis bacteriana no difiere clinicamente del padecimiento común y puede sospecharse de Candidiasis en el caso de que la terapia con antibióticos y sulfanilamida sea inefectiva.

Existen actualmente diversas técnicas inmunológicas para el

diagnóstico de la Candidosis en todas sus formas, basandose en la precipitación de antígenos con anticuerpos específicos o con la detección de metabolitos producidos por el hongo (41). Sin embargo, estos sistemas de diagnóstico presentan ciertas deficiencias pues la detección serológica de anticuerpos puede fallar si el paciente no puede producir una respuesta inmune adecuada o el suero es muestreado antes de que estos sean producidos, ya que aparecen varios días después de establecerse la infección, además de la necesidad de disociar el antígeno de Candida antes de proceder a su determinación. También es difícil su aplicación en aquellos casos en los que las lesiones son muy pequeñas o se encuentra muy localizada (6,33,41).

En el presente estudio se pretende establecer la situación de Candida como agente infeccioso en intestino humano en una porción de la población Mexicana, ya que estudios al respecto únicamente se han realizado en el extranjero y refiriéndose a grupos de pacientes específicos y, por lo mismo diferentes a la población abierta, que es con la que se pretende establecer un método de laboratorio auxiliar para el diagnóstico temprano de la candidosis.

H I P O T E S I S D E T R A B A J O

La candidosis intestinal es debida a factores predisponentes como la desnutrición, diabetes, uso de antibióticos y drogas inmunosupresoras, entre otras causas, siendo Candida albicans la especie más frecuentemente encontrada.

O B J E T I V O S

GENERALES:

- A).- Identificar algunos factores que predisponen para la aparición de Candida sp., como agente causal de diarrea.
- B).- Establecer un criterio de diagnóstico para candidosis intestinal en laboratorio.

PARTICULARES:

- A.1.- Recopilar los antecedentes personales patológicos de la historia clínica de cada individuo considerado para la muestra en búsqueda de factores predisponentes a candidosis.
- B.1.- Descartar los casos de diarrea que sean ocasionados por otros organismos diferentes a aquellos pertenecientes al género Candida.
- B.2.- Establecer cual es la especie del género Candida más común en el tracto gastrointestinal humano.
- B.3.- Relacionar el criterio de diagnóstico para Candida con la presencia de candidosis intestinal.

M E T O D O

El desarrollo del presente estudio se estableció en dos fases principales, las que corresponden a: clínica y laboratorio. Durante la fase clínica se registraron los antecedentes personales patológicos de 365 individuos muestreados, tanto de consulta externa como aquellos que se encontraban internados en el Hospital General de Zona # 58 del I.M.S.S. y que presentaron síndrome diarreico activo extrayendo tal información de su expediente médico personal o en su defecto de la solicitud de exámenes clínicos del laboratorio de la misma unidad.

La fase de laboratorio consistió en la elaboración de un frotis directo de la materia fecal, el cual fué teñido por la técnica de Gram (56) (ver apéndice), con el fin de observar la presencia de estructuras miceliales por medio del uso de un microscopio óptico con los objetivos seco fuerte y de inmersión, para establecer la presencia de Candida en fase infectiva en el intestino humano.

Simultáneamente a la realización del frotis se desarrollaron las técnicas de coprocultivo (CC) y coproparasitoscópico (CFS), estando esta última a cargo del personal del laboratorio del mismo H.G.Z. 58; por otra parte, se suspendió en 1 ml de solución salina de concentración fisiológica cada una de las muestras recibidas (0.3 gr. aproximadamente), la cual se sembró posteriormente por difusión en caja Petri en el medio de agar Nickerson (28) (Ver apéndice), misma que fué utilizada como medio de transporte al tiempo que permitía contar el número de colonias de Candida por unidad de masa en heces fecales una vez que se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas; así mismo, en base a la observación de tales placas se estableció la cantidad de unidades infecciosas por placa que deben ser tomadas en cuenta para considerar que Candida se encuentra en condiciones patógenas una vez que se practicó un análisis estadístico de Chi Cuadrada a un nivel de significancia de 0.005 y 1 grado de libertad por medio de la siguiente fórmula:

$$(15,50) \quad \chi^2 = \frac{2 \sum (O - E)^2}{E} = \frac{2 \sum (O - E)^2}{E}$$

O = Frecuencias Observadas de conteos < 100 colonias por placa en pacientes con candidosis.

E = Frecuencias Teóricas esperadas de conteos < 100 colonias por placa en pacientes con candidosis.

Al contar con el inóculo de la muestra en el laboratorio de microbiología y parasitología de la E.N.E.P. Iztacala, se procedió a la purificación de la cepa previamente aislada por suspensión de la misma en medio de Sabouraud líquido acidificado (ver apéndice) incubando este a 37°C por 24 hrs., antes de

resembrar en placa por cuadrantes en el medio de Agar Sabouraud acidificado (ver apéndice), a partir de la cual se establecieron las características macroscópicas de las colonias obtenidas y se realizaron los frotis respectivos, que se colorearon con azul de metileno para su posterior observación en el microscopio óptico en los objetivos seco debil y seco fuerte para definir sus características microscópicas antes de seleccionarla y preservarla en el mismo medio pero como agar inclinado en tubo. Una vez que se tenía la cepa purificada se comenzaron a realizar las pruebas siguientes para determinar la especie de Candida de la que se trataba:

A) PRODUCCION DE TUBO GERMINATIVO EN SUERO HUMANO:

Se suspendió una asada de la cepa problema en 0.5ml de suero sanguíneo humano contenido dentro de un tubo de ensaye, incubando este a 37°C para posteriormente determinar la formación de tubo germinativo a las 3 horas posteriores a su sembrado por observación en el microscopio óptico en una preparación en fresco con los objetivos seco debil y seco fuerte (27,37,39,44,49,51).

B) PRODUCCION DE CLAMIDOSPORAS:

Se inoculó una capa de Agar - Harina de Maiz - Tween 80 (ver apéndice) la cual se encontraba sobre portaobjetos y después se tapó con cubreobjetos incubando esta dentro de caja petri a 37°C por 24 horas, después de lo cual se observó en el microscopio óptico con los objetivos seco fuerte y debil para establecer si había desarrollo de tales estructuras (54).

C) ZIMOGRAMA DE FERMENTACION:

Inoculando cada cepa estudiada en un medio base de Wickerham con azul de bromotimol al 0.1 % como indicador, más una solución al 6 % de Lactosa, Maltosa, Glucosa, Sacarosa o Galactosa (ver apéndice) en proporción 3:1 para cada caso, todo esto contenido en los micropozos de placas de inmunoensayo, las cuales se incubaron a 37°C por 6 horas (11), para después observar en ellas el cambio de coloración del indicador en base al patrón de fermentación propio de cada especie de Candida (44).

Con los resultados obtenidos en las anteriores determinaciones y con las características macro y microscópicas observadas se determinó la especie de Candida aislada de cada caso estudiado (ver cuadro 1 y 2).

Finalmente se realizó la recopilación de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, con la finalidad de establecer cuales son las características que influyen en la aparición de Candidosis Intestinal en pacientes con diarrea, la especie de Candida que más comunmente la ocasiona así como el establecer un criterio de diagnóstico en base al número de colonias por unidad de masa presentes en heces fecales.

C U A D R O 1

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES PATOGENAS
DEL GENERO *Candida*.

ESPECIE	FORMA	CLAMIDOSPORAS	TUBO GERMINATIVO
<i>C. albicans</i>	GLOBOSA	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	OVOIDE	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	OVOIDE	-	-
<i>C. stellatoidea</i>	OVOIDE Y LARGA	+ -	+ -
<i>C. tropicalis</i>	GLOBOSA	+ -	+ -
<i>C. krusei</i>	CILINDRICA	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	OVOIDE Y LARGA	-	-

NOTA: LOS SIGNOS + Y - INDICAN LA CAPACIDAD DE PRODUCIR LAS ESTRUCTURAS INDICADAS

C U A D R O 2

PATRONES DE FERMENTACION DE LAS ESPECIES DE *Candida*
ASOCIADAS A PADECIMIENTOS HUMANOS

ESPECIE	GLU.	GAL.	MAL.	SAC.	LAC.
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	+	-	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	-

NOTA: LOS SIGNOS + Y - REPRESENTAN LA CAPACIDAD DE LA CEPA PARA FERMENTAR LOS AZUCARES USANDO MEDIO BASE DE WICKERHAM

GLU. = Glucosa, GAL. = Galactosa, MAL. = Maltosa,
SAC. = Sacarosa, LAC. = Lactosa.

Tomado de Castillo, M., 1989.

RESULTADOS

Durante el desarrollo del presente estudio se analizaron 365 muestras totales, de las cuales se lograron aislar la cantidad de 325 cepas de caracter levaduriforme, su distribución genérica se muestra en la gráfica 1, donde se puede apreciar el predominio de levaduras del género Candida con un total de 239 cepas, seguida de aquellas pertenecientes a Turulopsis con 57, además de 5 de Rhodosporiia y 1 del género Sporotrichum; en la misma gráfica se menciona también un grupo de 23 cepas no determinadas. Cabe señalar que en 141 casos del total no fue posible el aislamiento de cepas de este tipo, por lo que es necesario aclarar que para 85 individuos se logró el purificar más de una cepa.

Por otra parte, del total de cepas de Candida purificadas en el laboratorio y que se muestran en la gráfica 2, se obtuvieron todas aquellas especies que son consideradas como patógenos humanos. C. albicans con 102 cepas es la que se presenta con mayor incidencia, y en menor grado C. tropicalis con 61 y C. stellatoidea con 26.

La gráfica 3, por su parte, expone las causas generales que ocasionaron la diarrea en los casos muestreados, encontrando que la mayor parte de los individuos (43.56%) no presentan un agente etiológico definido que pueda provocar la diarrea, aún cuando en 74 casos de los mismos se haya aislado Candida de la misma muestra; también hace una representación de los casos en que se presentan infecciones parasitarias (21.64%), microbianas (10.96%), y mixtas (6.57%), considerando en este último parámetro a aquellos pacientes que, de acuerdo a los exámenes practicados, se les reconoció más de un posible agente etiológico. Así mismo, en la misma gráfica se observa un porcentaje de 17.26 que se refiere a etiología ocasionada por Candida, tomando en cuenta únicamente los factores predisponentes ya conocidos y mencionados con anterioridad.

Por otra parte, se puede apreciar en la gráfica 4 la proporción de casos en las que fue posible encontrar las estructuras pseudomiceliales a partir de la observación del frotis directo realizado para cada muestra, donde encontramos que la mayor frecuencia corresponde a los casos donde se diagnosticó la candidosis intestinal con el 100% de los mismos, siguiendo en orden de incidencia en los pacientes que presentaban infecciones bacterianas con 57.5%.

Para los casos donde se diagnosticó la candidosis intestinal, en la gráfica 5 se expone la procedencia de individuos seleccionados, encontrando un porcentaje de pacientes internados de 20.63, del servicio de consulta externa del mismo hospital general de zona se enviaron el 76.19% de las mismas y 2 muestras más (3.17%) corresponden a pacientes ajenos a la

institución, que fueron captados independientemente.

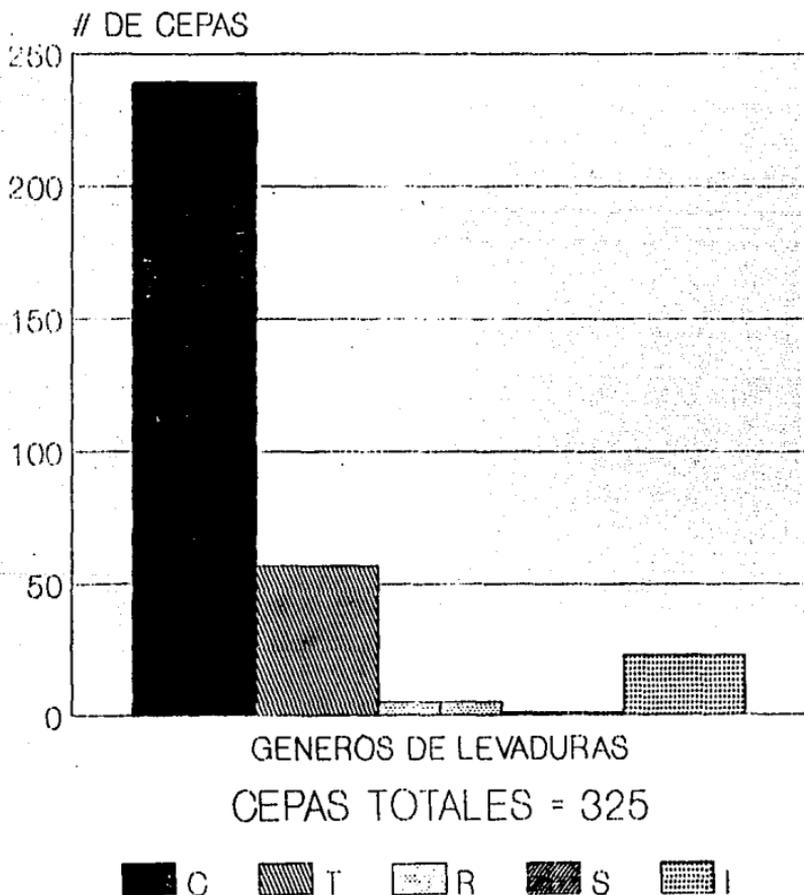
En el mismo caso, la gráfica 6 muestra una relación 2:1 en cuanto a la proporción de sexos, siendo mayor la población femenina en este grupo de pacientes. Finalmente, en la gráfica 7, se representa la distribución de grupos de edad, predominando en este parámetro la población adulta (83.92%) en una relación 4:1 comparandola con la cantidad muestreada de infantes (16.07%). Así mismo se encontró, de acuerdo a la gráfica 8, que la proporción de especies del género Candida encontradas como agente etiológico del síndrome diarreico señalan a C. albicans como la especie que más comunmente se asocia a este padecimiento con 43.21%.

Con respecto a la tabla 1, está señalando los factores más comunes y que más frecuentemente se encontraron en la población caracterizada como portadores de Candida en fase infectiva, encontrando que las causas iatrogénicas son las que principalmente ocasionan la candidosis intestinal en pacientes adultos, seguido de la anemia. Esta a su vez, y la desnutrición son las causas principales que determinan la transformación a patógeno de la población de Candida intestinal para el caso particular de los infantes, los cuales no sobrepasan la edad de 5 años. Aquí cabe hacer mención de que los padecimientos o deficiencias y factores predisponentes mostrados en la misma tabla no son entidades aisladas, sino que se encuentran asociadas entre ellas en más de un caso sobretodo en aquellos individuos que cursan con padecimientos crónicos y degenerativos.

Para finalizar se probó como correcta la hipótesis practicada en el análisis estadístico de Chi Cuadrada a un nivel de confianza de 0.995 y con un grado de libertad, la cual según la tabla 2, se observa que aquellas muestras que presentan menos de 100 colonias por placa pertenecen a pacientes que se caracterizan por no poseer inmunodeficiencias severas, sino más bien desórdenes intestinales ocasionados por la aplicación de antibióticos de amplio espectro, o bien se trata de pacientes que presentan este cuadro sintomático por deficiencias metabólicas. Por último, también incluyen individuos que no tienen la capacidad de generar una respuesta inmune adecuada por su condición anémica.

GRAFICA 1

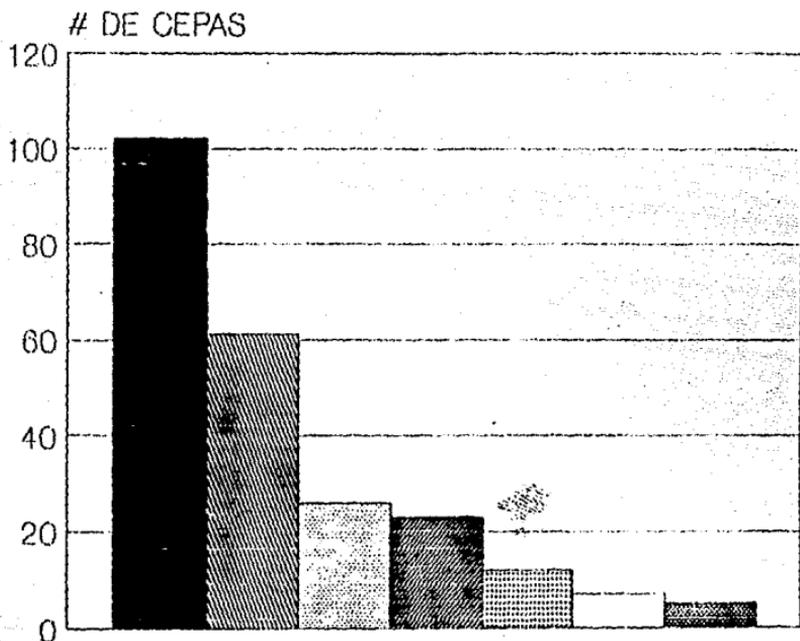
GENEROS DE LEVADURAS AISLADAS DE INTESTINO



C=Candida, T=Turulopsis, R=Rhodotorula,
S=Sporotrichum, I=Indeterminada.

GRAFICA 2

FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE ESPECIES DE Candida



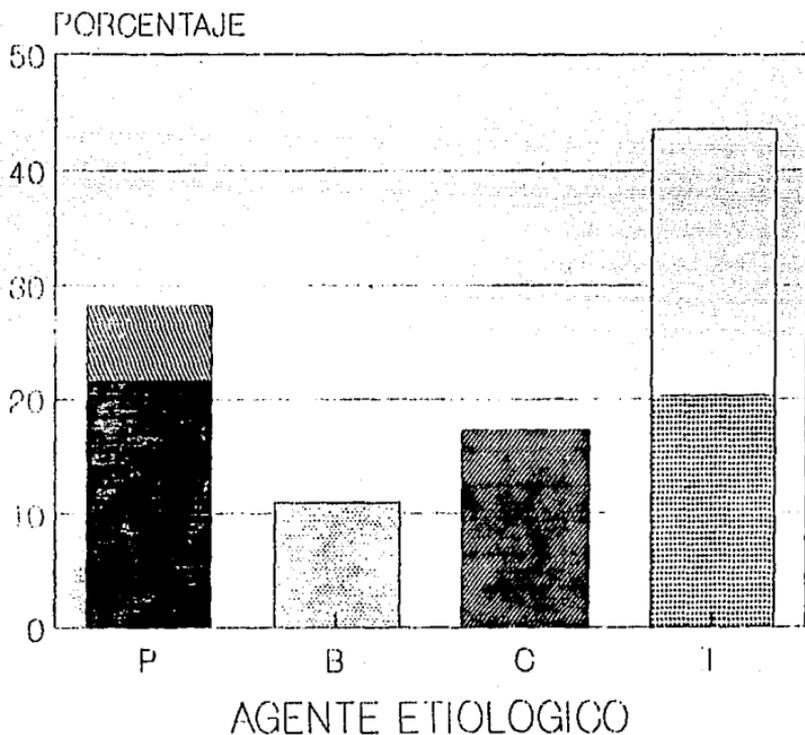
ESPECIES DE Candida



a=albicans, t=tropicalis, s=stellatoidea
k=krusoi, pa= parapsilosis,
g=guillermoidii, ps=pseudotropicalis.

GRAFICA 3

POBLACION TOTAL, AGENTES ETIOLOGICOS PRINCIPALES



P

P+B

B

C

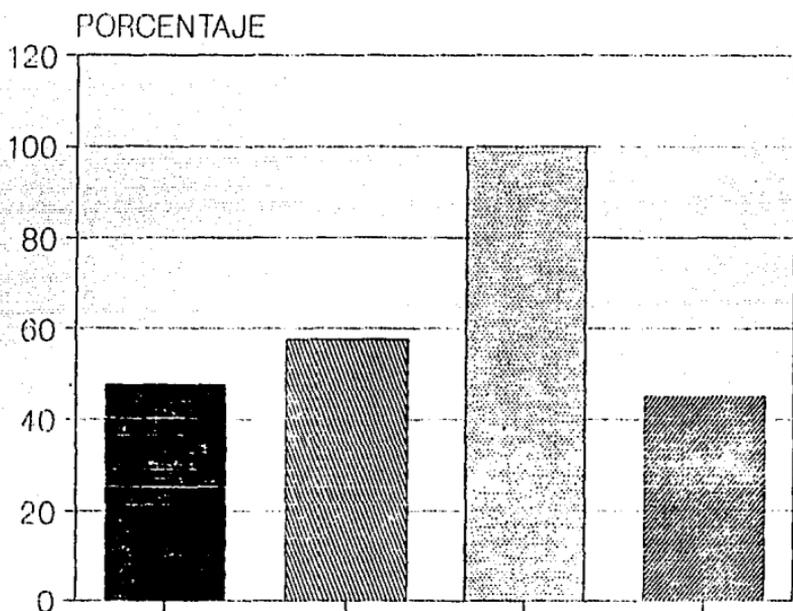
I C/C

I S/C

P-PARASITOS, B-BACTERIAS, G-CANDIDOSIS,
 I-INDETERMINADA, C/C-CON CEPA,
 S/C-SIN CEPA.

GRAFICA 4

PSEUDOMICELIO EN AGENTES ETIOLOGICOS GENERALES



AGENTES ETIOLOGICOS

■ PARASITOS

▨ BACTERIAS

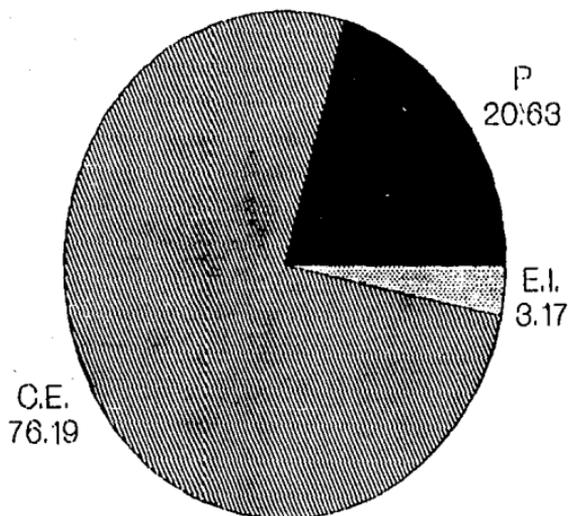
▩ CANDIDOSIS

▧ INDETERMINADO

PORCENTAJES EN BASE AL NUMERO
TOTAL DE PACIENTES DE CADA
ETIOLOGIA EN PARTICULAR

GRAFICA 5

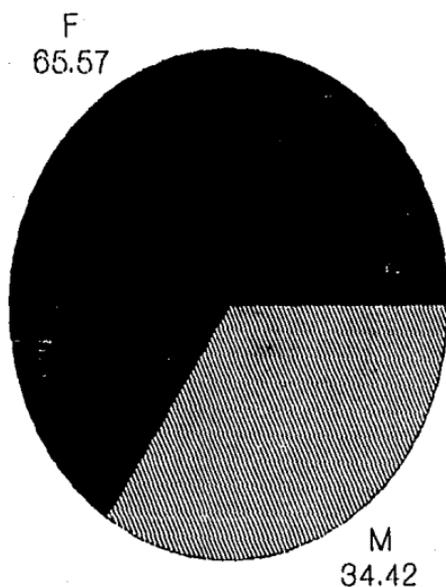
PROCEDENCIA DE PACIENTES CON CANDIDOSIS CONFIRMADA



P=Pacientes Internos
C.E.=Consulta Externa
E.I.=Extrainstitucionales

GRAFICA 6

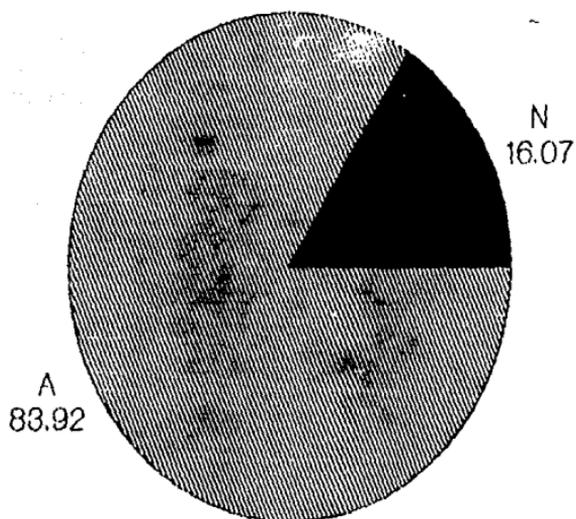
PROPORCION DE SEXO EN PACIENTES CON CANDIDOSIS



F=Femenino
M=Masculino

GRAFICA 7

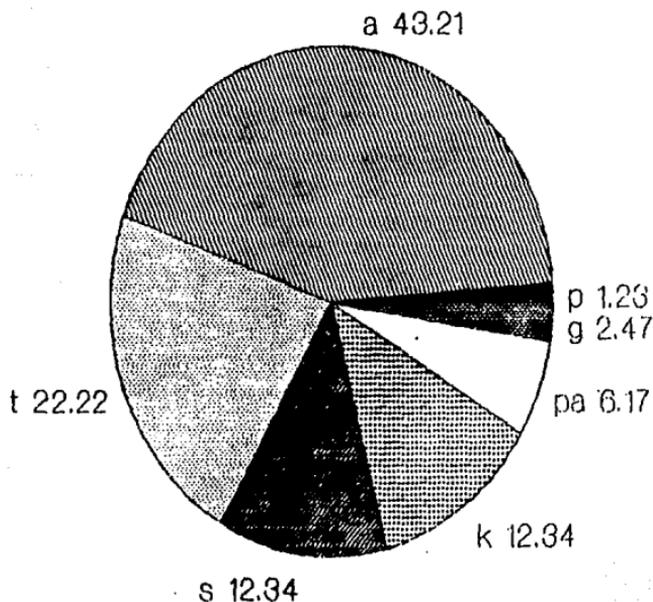
DISTRIBUCION DE EDADES EN PACIENTES CON CANDIDOSIS



N=Infantes
A=Adultos

GRAFICA 8

FRECUENCIA DE ESPECIES DE Candida EN CANDIDOSIS



PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS

p=pseudotropicalis, g=guilliermondii
a=albicans, t=tropicalis, k=krusei
s=stellatoidea, pa=parapsilosis.

T A B L A 1

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO Y CAUSAS PROBABLES
COMO FACTORES PREDISPONENTES A
CANDIDOSIS INTESTINAL

PADECIMIENTO	FEMENINO		MASCULINO	
	ADULTOS	INFANTES	ADULTOS	INFANTES
ALCOHOLISMO	1		1	
D.M. II	4		2	
IATROGENICO	13	2	5	1
ANEMIA	6	2	2	4
DESNUTRICION	1	2		
INFECCIONES AGUDAS	1 (T.R.)	1 (R.C.)		
INTOLERANCIA A CARBOHIDRATOS	1	1		
CANDIDOSIS	2 (C.V.)		1 (ESOF.)	
INSUFICIENCIA INMUNE			1 (S.M.P.)	
A.H.A.	1			
I.R.C.	2		2	
H.T.A.	1		3	
I.V.U.	1		2	
I.C.C.V.	1			

NOTA: LOS NUMEROS INDICADOS PARA CADA PADECIMIENTO
NO SON INDEPENDIENTES ENTRE SI.

D.M. II= Diabetes mellitus tipo II

T.R.= Tuberculosis renal

R.C.= Rinofaringitis cronica

C.V.= Candidosis vaginal

A.H.A.= Absceso hepatico amibiano

C.E.= Candidosis esofagica

I.R.C.=Insuficiencia renal cronica

S.M.P.= Sindrome Mieloproliferativo

H.T.A.= Hipertension arterial I.V.U.=infeccion de vias urinarias

I.C.C.V.=Insuficiencia cardiaca conjestiva venosa

T A B L A 2

CAUSAS QUE PROPICIAN
LA CANDIDOSIS INTESTINAL EN
MUESTRAS QUE PRESENTARON CUENTAS
MENORES A 100 COLONIAS POR PLACA.

# DE COLONIAS	DIAGNOSTICO O CAUSA		TRATAMIENTO
57	ALCOHOLISMO		
24	TUBERCULOSIS RENAL	IAT	AAE
56	COLITIS CRONICA; PROBABLE P.I.		
69	ANEMIA		
33	G.E.P.I.; BRONCONEUMONIA	IAT	AAE
31	RINOFARINGITIS CRONICA; C.P.R.T.	IAT	AAE
30	CERVICOVAGINITIS POR EMBARAZO; PROBABLE P.I.		
31	INTOLERANCIA A CARBOHIDRATOS		
87	COLITIS CRONICA		
75	ANEMIA		
28	COLITIS DE ETIOLOGIA A DETERMINAR		

AAE = Antibioticos de amplio espectro,
P.I. = Parasitosis intestinal, G.E.P.I. = Gastroenteritis
probablemente infecciosa, C.P.R.T. = Colitis parasitaria
rebelde a tratamiento, IAT = Iatrogenico.

DISCUSION

De acuerdo a la gráfica 1 además de la presencia de las levaduras del género Candida aisladas de intestino, se observa la presencia de otras levaduras pertenecientes a los géneros Turulopsis, Rhodotorula y Sporotrichum (2, 43), las cuales no se encuentran tan comunmente en la práctica médica, pero se han determinado como agentes causales de infecciones como consecuencia de las lesiones producidas por Candida(43), por lo que también son clasificadas como comensales oportunistas, aun cuando no se encuentran tan ampliamente distribuidas como aquellas especies que se incluyen dentro del género Candida. A este respecto existen diferentes opiniones, se dice que las levaduras de Turulopsis se encuentran tan relacionadas taxonomicamente a Candida que la separación de estos dos géneros es arbitraria pues se basa en la capacidad de las cepas para formar pseudohifas (Van Uden y Buckley, 43), y Turulopsis, según aclara Odds (5), puede formar estas estructuras ocasionalmente.

En la misma gráfica 1 se hace mención a un grupo de cepas indeterminadas, las cuales corresponden a una levadura esférica que no produce tubo germinativo ni clamidosporas y que, a diferencia de las especies de Candida encontradas aquí, tiene la capacidad de fermentar la lactosa, por lo que no fué posible su caracterización al no contar en el laboratorio con los recursos necesarios para tratar de determinarla mediante otras pruebas de fermentación con otros azúcares. En otro aspecto, es necesario mencionar que de los 365 casos trabajados, a 141 no se les aisló cepa de caracter levaduriforme, por lo que se aclara que en muchos casos se logró aislar mas de una cepa de Candida, o de las levaduras mencionadas anteriormente, a partir de la placa de agar Nickerson utilizada, encontrando aislamientos dobles, triples y cuadruples, ya fueran solo de cepas de Candida o mixtas respectivamente; esto refleja también que no es posible afirmar que este medio de cultivo es específico para levaduras del género Candida, lo cual concuerda con lo expuesto por Castillo, 1989 (11).

Ahora bien, con respecto a la gráfica 2, se encuentra que las tres primeras especies de Candida mencionadas corresponden a lo planteado por Stanley y Hurley (43), donde señalan las especies que más comunmente se encuentran en el organismo humano, no necesariamente asociadas a algún padecimiento de caracter micótico, y que es llamado por Odds "complejo albicans"(11).

Por su parte, la gráfica 3 hace mención a las principales causas generales que ocasionan la diarrea en los casos estudiados encontrando que, del total de muestras, el 43.56% de las mismas no se le determinó el agente etiológico que la ocasiona, pudiendose tratar de infecciones virales (23,46), aún cuando en 74 de estos casos si fué posible el aislamiento de Candida. la

cual no se consideró en fase infectiva, al no presentar alguna patología que pueda inducir la Candidosis (3,8,18,21,23,24,26 y 35). Además, Gorbach (25) y Cohen (12) han aislado estos hongos en heces fecales en una proporción mayor al 80% en personas normales.

Por otro lado, el 28.21% se atribuyen a parásitos, tales infecciones se dividieron a su vez en sus componentes adjuntos señalando las infecciones mixtas, cuando el coprocultivo mostró entidad patológica en el mismo paciente (6.57%). De igual manera se agrupan los casos en las que el principal componente etiológico lo constituyeron los agentes microbianos (10.96%). Para finalizar se señala una proporción de 17.26% de los casos (59 muestras) en los que se definió la candidosis intestinal una vez estudiado cada caso de manera individual, lo cual corresponde con algunos autores que establecen la frecuencia de esta del 11 al 27% en pacientes con cáncer y otros padecimientos debilitantes (20,47), en cambio Shastina encuentra el 62% en enfermos con SIDA (46).

Sin embargo para este grupo de pacientes, al igual que para aquellos en los que no se les determinó agente patológico alguno, no se descarta la posibilidad de la presencia de algún virus que se pudiera considerar como agente causal de la diarrea.

En la gráfica 4 podemos observar la incidencia de las estructuras pseudomiceliales para los diferentes grupos generales de patógenos, predominando como era de suponerse, en la población de pacientes con candidosis (100%), ya que la presencia de estas estructuras en el frotis directo de heces fecales fué considerado como un parámetro de referencia para llegar al diagnóstico de ésta enfermedad; sin embargo este tipo de estructuras también se encontraron en aquellas muestras en las que el agente etiológico lo constituyeron las bacterias (57.5%), lo que hace suponer que en estos casos se encontraba una infección mixta micótico-bacteriana como las expuestas por Shastina, 1986 (46) en las que al estar ambas entidades etiológicas en fase infectiva resulta mucho más difícil su tratamiento efectivo.

De igual manera se expusieron los casos en los que las pseudohifas se encontraron asociados a pacientes parasitados (47.57%) y en aquellos en los que no se estableció la causa del síndrome diarreico (46.54%), esto se cree que tiene una gran importancia, ya que al considerarse tales estructuras como indicadores de la fase infectiva del hongo (20), un tratamiento inadecuado del paciente provocaría invariablemente el desarrollo descontrolado de las poblaciones de Candida en el intestino y por lo tanto la generación de candidosis intestinal por medios iatrogénicos.

Por otra parte, del grupo en que se diagnosticó candidosis se analizaron los datos de ingreso, con los cuales se construyó la gráfica 5, encontrando que la proporción de pacientes internados con candidosis intestinal es muy baja, aún cuando se consideran un grupo de alto riesgo (34), en relación a los

pacientes que provienen del servicio de consulta externa. Esto se debe principalmente a que, al ser un hospital general de zona el lugar donde se obtuvieron las muestras, se propicia la concentración de pacientes que solicitan los servicios de análisis clínicos, aún cuando se encuentren asignados a las unidades de medicina familiar periféricas al hospital, ya que las unidades mencionadas no cuentan en sus instalaciones con un laboratorio clínico, por lo que sus pacientes son remitidos al laboratorio central de la zona a la que pertenece.

Con respecto a las dos muestras de pacientes denominados extrainstitucionales que aparecen en la misma gráfica 5. corresponden a pacientes captados directamente en el laboratorio de microbiología y parasitología de la E.N.E.F. Iztacala, las cuales fueron integradas al estudio por la facilidad de contar con sus antecedentes patológicos personales, así como un diagnóstico más preciso de su padecimiento.

Para la proporción de sexos, la gráfica 6 señala la dominancia de los pacientes femeninos, casi doblando a la población masculina, con un porcentaje de 65.57 la primera y de 34.42 en la última, no siendo esto más que el reflejo de la población muestreada, lo cual no implica una mayor susceptibilidad de adquirir este tipo de infecciones por parte de individuos pertenecientes al sexo femenino.

En la gráfica 7 la población de carácter adulto, mayores de 18 años, domina en cantidad sobrepasando a la población infantil (menor a 5 años) por cinco veces, dado que los casos de adultos provenientes de consulta externa eran la mayoría con lo que se logra por esa parte un muy alto aporte de casos.

La gráfica 8, por su parte, expone la frecuencia de las diferentes especies del género Candida que se determinaron en este caso como patógenos en el intestino humano, confirmando lo dicho por Trier y Bojorkman (53), al respecto de que C. albicans es la especie más frecuente en infecciones micóticas en el tracto intestinal (33), en este caso con 41.77%, seguidas de C. tropicalis (25.32%), y C. stellatoidea (13.5%), sin embargo las otras especies mencionadas no presentan la misma distribución o patogenicidad en la población estudiada que la mencionada en la literatura (35,43).

En cuanto a las causas probables que promovieron la aparición de la candidosis intestinal en este estudio, se muestra un comportamiento desigual dependiendo del grupo de edad en el que se presentan. La tabla 1 señala que para adultos, el principal factor que predispone para la aparición de esta etiología es la medicación, es decir la candidosis aparece como respuesta iatrogénica del tratamiento aplicado a los pacientes, ya que cada día es más común encontrar en la práctica médica el uso indiscriminado de los llamados antibióticos de amplio espectro, para el caso en particular por ejemplo Ampicilina, Neomicina, entre otros, que son utilizadas como tratamiento efectivo contra una gama muy amplia de organismos causantes de la

enterocolitis bacteriana, pero que a su vez provocan desórdenes en fenómenos como la Dysbacteriosis y el hecho de impedir la expresión de los anticuerpos específicos por el propio organismo (3,8,9,10,17,18,24,26 y 34).

En segundo término, se presenta la anemia, que de sí provoca una deficiencia en la respuesta inmune del individuo al no proveer un adecuado suministro de oxígeno al organismo, lo que a su vez se traduce en una disminución en la actividad metabólica generalizada, incluyendo por supuesto a las células que forman parte del sistema de defensa del individuo (26,33). En tercer lugar se muestra la Diabetes Mellitus II que es un padecimiento muy ampliamente distribuido en nuestro país y que para este caso se encontró asociado en mayor cantidad a aquellos pacientes del sexo femenino al ser mayor su aporte a la población total. La Diabetes en adultos se caracteriza por presentar un desorden endócrino severo que afecta a todo el organismo, facilitando en éste mismo el establecimiento de poblaciones microbianas de cualquier clase, además de disminuir la capacidad de respuesta hacia este tipo de agresiones por parte del individuo afectado (24).

Con respecto a los niños con candidosis intestinal se observa que la principal causa es la anemia, que aparte de disminuir la capacidad defensiva del organismo, este grupo de edad se caracteriza por presentar una inmadurez natural de su sistema inmune, ya que en esta etapa el organismo aún no tiene la capacidad de reconocimiento de antígenos totalmente desarrollada (3,10,33). Los factores iatrogénicos pasan a segundo término en este caso y posteriormente la desnutrición, la cual conlleva una deficiencia metabólica generalizada (3,23,26,32,33, 35,42,55), que aumenta por supuesto, la susceptibilidad del organismo para contraer todo tipo de enfermedades, propiciando además una evolución clínica más lenta, complicaciones más frecuentes e incluso pueden causar reacciones alérgicas indeterminadas (16). Para terminar cabe aclarar que la candidosis no es establecida por únicamente un padecimiento general, sino que responde a un conjunto de deficiencias fisiológicas del hospedero, lo que facilita y propicia la transformación de la población de estas levaduras a la fase patógena.

En cuanto a la prueba estadística practicada, se eligió el método ya mencionado, primeramente por la facilidad de manejo en cuanto a los datos para integrarlos en su ecuación básica, aparte de poseer los atributos del requerimiento de un número mínimo poblacional bajo ($n=30$) y la capacidad de poder relacionar los datos provenientes de una población abierta, a niveles de confianza muy precisos (15,50).

Para el análisis estadístico de Chi Cuadrada se encontró que en aquellos casos donde se estableció una cuenta mayor a 100 colonias por placa de agar Nickerson (0.3g de materia fecal) pueden considerarse como un parámetro más que auxilia a la determinación de la candidosis intestinal, comprobándose esto a

un nivel de confianza de 0.995 con un grado de libertad, no queriendo decir que cuentas como las expuestas son señales inequívocas de la presencia del padecimiento, sino que puede tomarse como un indicador que muestre la necesidad de revisar los antecedentes patológicos del paciente que cursa con diarreas frecuentes, rebeldes a tratamiento o crónicas (23) en busca de una posible candidosis intestinal.

La tabla 2 hace una comparación de aquellos casos en los que ya definida la candidosis se encontraron cuentas de colonias menores a 100, bajo las condiciones ya establecidas, observándose que algunos de estos casos de candidosis intestinal fueron provocados iatrogénicamente y que los pacientes respectivos no presentaban cuadros definidos de una deficiencia inmunitaria severa, no sucediendo lo mismo en aquellos pacientes cuya situación inmunológica se encuentra más comprometida, presentando un comportamiento diferente, pues las placas sembradas de dichas muestras incluían cuentas de hasta 800 colonias o más, aunque estos conteos no son indicadores exclusivos o rotundos de la presencia de levaduras del género Candida en fase infectiva dentro del intestino en un paciente con síndrome diarreico.

CONCLUSIONES

En base a todo lo expuesto anteriormente se establecen las siguientes conclusiones al respecto:

- Los factores predisponentes que más comunmente son asociados a la aparición de candidosis intestinal son: en adultos, los de origen iatrogénico, y en niños, la anemia.
- La frecuencia de aparición de la candidosis intestinal en la población estudiada es del 17.26%.
- La especie de Candida que más comunmente se encuentra en el tracto intestinal, y por lo mismo la que más frecuentemente es el agente etiológico de este padecimiento es Candida albicans.
- Un conteo de más de 100 colonias en placa de agar Nickerson, con 0.3g aproximados de materia fecal sembrados por difusión, puede considerarse como un parámetro auxiliar para el diagnóstico de candidosis intestinal.

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

- 1.- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W. Introducción a la Micología, Ed. Omega, Barcelona, España, 1985, pp.191-557
- 2.- Bailey, W.R. & Scott, E.G. Diagnostic Microbiology The C.V. Mosley Co., U.S.A., 1982, p.p. 225-246..
- 3.- Microbial Flora and Disacchaidase Depression in Infantile Gastroenteritis, Acta Pediatrica Scandinavica, 63: 423-426, 1974.
- 4.- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 3rd. ed., Burgess Publishing Co., U.S.A., 1972, 820 pp.
- 5.- Barnett, J.A. A guide to identifying and Clasifying Yeasts, Cambridge University Press, G.B. 1979, 313 p.p.
- 6.- Bennett, J.E. Rapid Diagnosis of Candidiasis and Aspergilliosis. Reviews of Infectious Diseases, 7: 398-402, 1987.
- 7.- Berry, D.R. Biology of the Yeasts, Edward Arnold Publishers, London, G.B., 1982, 1032pp.
- 8.- Bhaskaram, C. & Reddy, V. Cell Mediated Immunity in Protein-Caloric Malnutrition. Journal of Tropical Pediatrics and Environmental Child Health, 20: 284-288, 1974.
- 9.- Bodey, G.P. Candidiasis in Cancer Patients. The American Journal of Medicine, oct.: 13-48, 1984.
- 10.- Bycov, V.L. Experimentally Induced Alimentary Tract Candidosis in Neonates. S.M. Kirov Leningrad State Institute of Postgrade Medical Training, 26: 45-49, 1986.
- 11.- Castillo R., M. Incidencia de Diferentes Especies de Candida en Infecciones Faringeas y Vaginales, con Aplicación de una Microtécnica en el Laboratorio Util en el Diagnóstico de Candidosis. Tesis Profesional, Biologo, E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M. Mayo, 1989.
- 12.- Cohen, R.R.F., Delgado E., Ahern D.G., Kaiser M.H.. Fungal Flora of the Normal Human Small and Large Intestine. N.Engl. J. Med.. 280: 638-641, 1969.
- 13.- Cole, G.T. & Kendrick, B.B. Biology of Conidial Fungi, vol. I y II, Academic Press, N.Y., U.S.A., (1981), 3-35.
- 14.- Dammin, G.J. "The Patogenesis of Acute Diarrheal Disease in Early Life". Bulletin of the World Health Organization. 31: 29-32, 1964.
- 15.- Daniel, W.W. "Bioestadística", Ed. Limusa, México, 1982, 912pp.

- 16.- Di Febo, G., Mignoli, G., Biasco, F., Lizza, G. Candida albicans Infections of Gastric Ulcer. Frequency and Correlation with Medical Treatment. Digestive Diseases and Sciences, 30: 178-181, 1985.
- 17.- Domer J.E. & Hector, R.F. Enhanced Immune Responses in Mice Treated with Penicillin-Tetracycline or Trimethoprim-Sulfametoazole when Colonized Intragastrically with Candida albicans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May: 691-697, 1987.
- 18.- Ekenna, G. & Sherertz, R. Factors Affecting Colonization and Dissemination of Candida albicans from the Gastrointestinal Tract of Mice. Infection and Immunity, July: 1558-1563, 1987.
- 19.- English, Mary P. Medical Mycology. Studies in Biology #119, Edward Arnold Publishers, G.B., 1980, 78pp.
- 20.- Eras, P., Goldstein, M.J., Sherlock P. Candida Infection of the Gastrointestinal Tract. Medicine, 51: 367-379, 1972.
- 21.- Fisher, D., Labayle, D., Versapuech, J.M. Atteinte Candidosique de L'intestine Gréle Compliquée de Perforation. Un Cas D'évolution Favorable. Gastroenterol. Clin. Biol., 11: 514-517, 1987.
- 22.- Fuller, H.J. Botánica. Sa. ed. Ed. Interamericana, México, 1985, 512pp.
- 23.- Girard, P.M., Marche, C., Maslo, C., Rene, E. Las Manifestaciones Digestivas del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Gastroenterol. Clin. Biol., 9: 327-335, 1985.
- 24.- Gelb, A. & Miller, S. AIDS and Gastroenterology. The American Journal of Gastroenterology. 81: 619-621, 1986.
- 25.- Gorbach, S., Nahas, L., Lerner, P., Weinstein, L. Studies of Intestinal Microflora. Effects of Diet, Age and Periodic Sampling on Numbers of Fecal Microorganisms in Man. Gastroenterology, 53: 845-855, 1967.
- 26.- Gracey, M., Stone, D.E. Isolation of Candida Species from the Gastrointestinal Tract of Malnourished Children. American Journal of Clinical Nutrition, 27: 345-349, 1974.
- 27.- Hazen, K.C. & Hazen, B.W. Temperature-Modulated Physiological Characteristics of Candida albicans. Microbiol. Immunol., 31: 497-508, 1987.
- 28.- Hellgren, L., Svindland, H.B. & Vincent, J. Miniaturized Culture Procedure for Diagnosis of Candidiasis. Microbios Letters. 8: 139-142, 1979.
- 29.- Jawets, E. Microbiología Médica. 11a. ed., Ed. El Manual Moderno, México, 1985, 310-330.

- 30.- Joshi, S.N., Garvin, P.J. & Sunwood, Y.C. Candidiasis of the Duodenum and Jejunum. Gastroenterology. 80: 829-833, 1981.
- 31.- Kirkparick, Ch.H. Host Factors in Defense Against Fungal Infections. Am. J. Med., oct., 39-43, 1984.
- 32.- Larracilla, J., Peñalosa, J., y Barries, U. Edad y Estado Nutricional en la Evolución de Lactantes con gastroenteritis. Revista Mexicana de Pediatría. 52: 343-348, 1985.
- 33.- Martuscelli, A., López, R., Thomas-Campuzano. Candidosis Bucal en Lactantes con Enfermedad Diarreica. Gaceta Médica de México. 106: 309-318, 1973.
- 34.- Mazumdar, P.K., Marks, M.I. Candida albicans Infections in Hospitalized Children. Clinical Pediatrics, 14: 123-129, 1975.
- 35.- Mensel, I. & Holzman, H. Consideraciones Acerca de Exceña Ceborreica y Psoriasis del Cuero Cabelludo en relación a Micosis Intestinal. Z Hantkr, 61: 451-454, 1986.
- 36.- Platenkamp, G.J., Van Duin, A.M., Diatgnosis of Invasive Candidiasis in Patients with and without Signs of Immune Deficiency: A Comparison of Six Detection Methods in Human Serum. J. Clin. Pathol. 40: 1162-1167, 1987.
- 37.- Odds, F.C. Candida and Candidosis, University Park Press, Baltimore, U.S.A., 1979, 362pp.
- 38.- Odds, F.C. and Abbott, A.B. A Simple System for the presuntive Identification of Candida albicans and Differentiation of Strains within the Species. Saboudraudia, 21: 301-317, 1980.
- 39.- Odds, F.C. and Abbott, A.B. Modification and extension of tests for diferentiation of Candida Species and Strains. Sabouraudia, 21: 79-81, 1983.
- 40.- Odds, F.C. Ecology and Epidemiology of Candida Species. Zbl. Bakt. Hyg., 257: 207-212, 1984.
- 41.- Polachek, I., Melamed, M., Bercovier, H. Beta-Glucosidase in Candida albicans and Its Application in Yeast Identification. Journal of Clinical Microbiology. 25: 907-910, 1987.
- 42.- Reddy, V., Raghuramulu, N. & Bheekaram, C. Secretory IgA in Protein-Caloric Malnutrition. Achieves of Diseases in Childhood, 51: 871-874, 1976.
- 43.- Rose, A.H. & Harrison, J.S., The Yeasts, Academic Press, London, G.B., 1969, pp. 32-143.

- 44.- Segal, E. and Ajello, L. Evaluation of a new system for the Rapid Identification of Clinically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 4: 157-159, 1976.
- 45.- Selveraj, R.J. & Ehat, S.K. Metabolic and Bactericidal Activities of Leukocytes in Protein-Caloric Malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 25: 166-172, 1972.
- 46.- Shastina, G.V. Morphologic Manifestations of Intestinal Lesions of Bacterial and Mycotic Etiology Combined with Acute Respiratory Infections. *Leningrad Ped. Med. Inst.*, 15: 37-44, 1986.
- 47.- Smith, J. M.D. Mycosis of the Alimentary Tract, Progress Report. *Gut.*, 10: 1035-1040, 1979.
- 48.- Sevilla, M.J. and Odds, F.C. Development of Candida albicans hyphae in Different Growth Media-Variations in Growth Rates, Cell Dimensions and Timing of Morphogenetic Events. *Journal of General Microbiology*, 132: 3083-3088, 1986.
- 49.- Sheklakov, N.D. & Milich, M.V., "Mycoses in Man", MIR Publishers, Moscow, U.R.S.S., 1974, pp. 145-177.
- 50.- Spiegel, M.R. "Estadística", Ed. McGraw - Hill, México, 1970, pp. 201-216.
- 51.- Tashdjian, C.L., Burenal, J.J. and Kozinni, P.J. Rapid Identification of Candida albicans by filamentation on Serum and Serum Substitutes. *Am. J. Dis. Child.*, 99: 212-215, 1960.
- 52.- Thorn, G.W., *Medicina Interna de Harrison*, Vol.1, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1981, pp. 1110-1115.
- 53.- Trier, J.S. & Bjorkman, D.J. Esophageal, Gastric and Intestinal Candidiasis. *Am. J. Med.* 77: 39-43, 1984.
- 54.- Vidotto, S., Caramello, S. and Gallo, M.G. A New Medium for the Production of Chlamydoconidia by Candida albicans. *Mycopathologia*, 95: 73-75, 1986.
- 55.- Viteri, F.E. & Schneider, R.E. Gastrointestinal Alterations in Protein-Caloric Malnutrition. *Medical Clinics of North America*, 58: 1487-1505, 1974.
- 56.- Wistreich, G.A. & Lechtman, M.D. Laboratory Exercises in Microbiology, 3a. ed., Ed. Glencoe Press, Cal. U.S.A., 1976, 1423 pp.
- 57.- Zapater, R.C. *Micología Médica*, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1981, pp. 8-240.

APENDICE

**COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
PROPUESTOS EN EL ESTUDIO**

A) Agar Nickerson:

Indicador de Bismuto y Sulfito	7.0	g/l
Glucosa	10.0	g/l
Glicina	10.0	g/l
Extracto de Levadura	1.0	g/l
Agar Desechado	15.0	g/l

NO DEBE ESTERILIZARSE EN AUTOCLAVE. LA SUSPENSION SE REALIZA EN CALIENTE ANTES DE VACIARSE EN CAJA PETRI

B) Agar Sabouraud Acidificados:

Peptona de Carne	5.0	g/l
Peptona de Caseina	5.0	g/l
D(+)-Glucosa	40.0	g/l
Agar-Agar	15.0	g/l

AJUSTAR A pH=5.0 GOTTA A GOTTA CON HCl 0.1N, ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 15psi/15' ANTES DE VACIARSE EN CAJA PETRI.

C) Sabouraud Liquido Acidificados:

Peptona de Carne	5.0	g/l
Peptona de Caseina	5.0	g/l
D(+)-Glucosa	10.0	g/l

AJUSTAR A pH=5.0 GOTTA A GOTTA CON HCl 0.1N, ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 15psi/15' UNA VEZ QUE SE HAYA VACIADO EN TUBOS DE ENSAYE DE 13X70.

D) Agar Harina De Maiz + Tween 80:

Harina de Maiz-Agar	17.0	g/l
Tween 80	10.0	ml/l

HOMOGENEIZAR LA MEZCLA DE AGAR-HARINA DE MAIZ EN CALIENTE PARA ANADIR, ENTONCES EL TWEEN 80, ANTES DE ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 15psi/15' VACIANDO SOBRE PORTAOBJETOS PREVIAMENTE ESTERILIZADO. UNA VEZ GELIFICADO EL MEDIO ESTA LISTO PARA INOCULARSE.

E) Medio Base de Wickerham:

Extracto de Levadura	4.5	g/l
Lactoseptona	7.5	g/l

UNA VEZ HECHA LA SOLUCION SE AGREGA EL INDICADOR AZUL DE BROMOTIMOL AL 1% EN ETANOL ENTES DE MEZCLARSE CON LA SOLUCION DEL AZUCAR AL 6% CORRESPONDIENTE EN RELACION 3:1. SE ESTERILIZA EN AUTOCLAVE A 15psi/15'. SE PUEDEN REALIZAR LAS PRUEBAS EN TUBO DE ENSAYE O PLACAS DE INMUNDENSAYO.

TECNICA DE GRAM

- A) CRISTAL VIOLETA
- | | |
|-------------------|-------|
| CRISTAL VIOLETA | 2 g |
| ALCOHOL 96% | 20 ml |
| OXALATO DE AMONIO | 0.8g |
| AGUA DESTILADA | 80 ml |
- B) LUGOL
- | | |
|-------------------|-------|
| IODO | 50 g |
| YODURO DE POTASIO | 100 g |
| AGUA DESTILADA | 1 L |
- C) SAFRANINA
- | | |
|----------------|--------|
| SAFRANINA | 0.25 g |
| ALCOHOL 96% | 10 ml |
| AGUA DESTILADA | 100 ml |
- D) SOLUCION DECOLORANTE
- | | |
|----------------------|-----|
| ACETONA - ETANOL 96% | 1:1 |
|----------------------|-----|

La tinción de Gram se realiza cubriendo el frotis a tratar con el cristal violeta (A) durante 1', después de lo cual se lava abundantemente con agua. Posteriormente se aplica la solución de lugol (B) dejandola actuar durante 1' y lavandola con la solución decolorante D rápidamente y con un volumen aproximado de 0.5ml por goteo. Finalmente se añade la safranina (C) durante 30" antes de enjuagar con agua antes de observar la preparación.