

## ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS INDISPENSABLES PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE CANDIDA

ESTHER CASTILLO DE THEILKUHL, Profesora Asistente, Sección de Microbiología.

### INTRODUCCION

Se pudo comprobar de nuevo (18) que las características macroscópicas y microscópicas celulares y del crecimiento de las *Candidas* en medios aconsejados corrientemente para ello, son datos de gran valor para hacer diferenciación y comprobación del género, pero insuficientes por sí solos cuando se trata de hacer diferenciación en especies, dado que dichos microorganismos aunque aparentemente simples, son complejos y variables no solo en cuanto a su forma sino también en sus caracteres fisiológicos, bioquímicos, antigénicos, etc. Se necesita entonces, de la coordinación tanto de las características anotadas como de resultados sobre comportamiento bioquímico, para llegar a la diferenciación de especies cuando por circunstancias inherentes al trabajo mismo o por curiosidad investigativa quiere complementarse el estudio taxonómico. No obstante que el estudio bioquímico complementario conduce, según bibliografía, al esclarecimiento de la especie, tampoco la clasificación podría basarse en dichos resultados únicamente, ya que como se anotó anteriormente (*Revista Colombiana de Ciencias Químico Famacéuticas*, Vol. 2, Nº 2), los microorganismos en cuestión presentan también variación bioquímica.

El motivo de este trabajo es confirmar la necesidad que el conocimiento del comportamiento bioquímico (reacciones de fermentación y reacciones de asimilación de carbono, especialmente)

pueden aportar para el estudio taxonómico de las *Candidas*, como también, hacer comprobación de la variación bioquímica presentada por las mismas.

Para tal fin, con 40 cepas de levaduras aisladas a partir de secreciones vaginales y vulvo-vaginales y las cuales fueron sometidas por métodos diversos, al estudio de sus características macroscópicas y microscópicas, en base de las cuales se hizo la diferenciación del género de 36 de éllas (18), se hace la continuación del trabajo, tendiente a la diferenciación de especies y a la comprobación de la variación bioquímica.

#### 1. — REVISION BIBLIOGRAFICA

En base de estudios taxonómicos realizados por buen número de investigadores (2, 3, 4, 6, 8, 9, 10) acerca del género *Candida* y otros géneros de levaduras, se han establecido técnicas y métodos que son seguidos como guías o pautas convencionales en trabajos de investigación realizados en tal sentido y los cuales, al menos en parte, merecen consideración (18).

Para estudios taxonómicos más detallados (identificación de especies) Lodder y Kreger van Rij consideran más definitivos los resultados obtenidos con relación a reacciones de fermentación y reacciones de asimilación de carbono; pueden también tenerse en cuenta algunos datos complementarios sobre requerimientos de vitaminas, utilización de nitrógeno, desdoblamiento de arbutina, producción de pigmentos, etc. (2, 5, 6, 10).

La bibliografía aporta igualmente datos, al parecer muy valiosos, sobre otros métodos y técnicas experimentadas por investigadores en los últimos años, tendientes también al estudio taxonómico de las levaduras, en especial de los géneros *Saccharomyces* y *Candida*, basados en el análisis de la composición básica del DNA (ácido desoxirribonucleico) (1, 16) y de las características antigénicas (11, 12, 13, 14, 17) que podrían conducir a resultados más exactos en clasificación y a despejar las dudas aún existentes.

#### 2. — MATERIALES Y METODOS

Se realizó el experimento con 40 cepas de levaduras aisladas a partir de secreciones vaginales o vulvo-vaginales, las cuales fue-

ron analizadas previamente por diversos métodos para hacer el estudio de las características macroscópicas y microscópicas, y de las cuales 36 fueron identificadas como pertenecientes al género *Candida* (18).

La parte experimental de este trabajo comprende el estudio bioquímico (reacciones de fermentación y asimilación de carbono) y la comprobación de la variación bioquímica presentada por este género de levaduras.

### 2.1. *Reacciones de fermentación.*

Teniendo como medio básico el caldo base rojo de fenol (Difco), (15) se prepararon soluciones al 1% de cada uno de los siguientes azúcares: maltosa, lactosa, dextrosa, galactosa y sacarosa.

Las soluciones fueron preparadas y esterilizadas de acuerdo con las instrucciones de la casa Difco y envasadas en cantidad de 7 ml. para cada tubo de Durham.

Cada una de las cepas de levaduras aisladas fue sembrada en cada una de las soluciones de azúcares ya anotadas.

*Inóculo:* Las cepas de levaduras inicialmente aisladas en agar glucosado de Sabouraud con sulfato de neomicina, fueron pasadas al mismo medio de cultivo envasado en tubo, incubadas a 37°C por 48 horas para su desarrollo y mantenidas constantemente en refrigeración a 8°C.

De estas cepas así mantenidas se suspendió una asada en 2 ml. de solución salina isotónica estéril (0.85%) y de esta suspensión, previa agitación, se tomó como inóculo 0.1 ml. para cada una de las soluciones de azúcares.

Los cultivos fueron incubados por períodos de 48 horas a temperaturas de 37° C, observados después de su incubación y anotadas las reacciones correspondientes.

Las fermentaciones, indicadas por un cambio marcado de color del medio de fucsia a amarillo intenso se indican como positivas: +; en caso de no haber cambio de color la reacción se tomó como negativa: —; las reacciones débiles se indican como: ±.

### 2.2. *Reacciones de asimilación.*

Para las reacciones de asimilación de carbono se utilizaron los mismos carbohidratos utilizados para las reacciones de fermentación, más el etanol en concentraciones al 1% adicionados al medio básico.

*Inóculo:* Se empleó el mismo tipo de inóculo y en la misma cantidad, que el empleado para las pruebas anteriores.

Los cultivos fueron incubados a 37°C por períodos de 48 y 72 horas, anotándose los resultados después de cada período de incubación.

Se tuvo como criterio el crecimiento o no del microorganismo, informados como positivo o negativo respectivamente (+ o —).

En algunos casos en que las reacciones de asimilación aparecieron poco claras fueron seguidamente repetidas siguiendo el mismo procedimiento anotado y en las mismas condiciones empleadas para el ensayo anterior.

### 2.3. *Comprobación de la variación bioquímica.*

Transcurrido un período de dos meses y habiendo mantenido las cepas puras en agar - glucosado de Sabouraud, envasado en tubo y en refrigeración a 8°C, se practicaron de nuevo reacciones de fermentación con el ánimo de verificar los resultados de las reacciones de fermentación anteriormente practicadas y de verificar la variación bioquímica presentada, según bibliografía, por especies de *Candida*.

Las reacciones fueron practicadas en forma idéntica a las anteriores, haciendo incubación de los cultivos a 37°C por períodos de 48 y 72 horas, después de los cuales se anotaron los resultados obtenidos.

## 3. — RESULTADOS

### 3.1. *Reacciones de fermentación.*

Practicadas las primeras reacciones de fermentación sobre los azúcares: maltosa, lactosa, glucosa, galactosa y sacarosa con cada una de las 40 cepas de levaduras aisladas (18) se obtuvieron los resultados anotados en el cuadro N° 1.

### 3.2. *Reacciones de asimilación.*

Realizadas las pruebas de asimilación de carbono de los compuestos orgánicos: maltosa, lactosa, glucosa, galactosa, sacarosa y etanol, se obtuvieron los resultados resumidos en el cuadro N° 2.

Reuniendo los datos obtenidos inicialmente sobre características macroscópicas y microscópicas celulares y del crecimiento (18) con los datos aquí resumidos (cuadros números 1 y 2) sobre reacciones de fermentación y asimilación de carbono practicadas sobre las 40 cepas de levadura aisladas de secreciones vaginales o vulvo - vaginales, se logró, no sin dificultad, hacer identificación por especies de las levaduras y establecer la incidencia relativa entre las siete especies asociadas por lo común con candidiasis humanas, en nuestro medio, en caso de vaginitis o vulvo - vaginitis por *Candida*.

## CUADRO NUMERO 1

## REACCIONES DE FERMENTACION

37°C por 48 horas

Cepa N°	Lactosa 1%	Maltosa 1%	Sacarosa 1%	Dextrosa 1%	Galactosa 1%	Especie
1a	—	+ G	—	+ G	+	<i>C. albicans</i>
2b	—	—	—	+ G	+	<i>C. albicans</i>
2	—	+ G	—	+ G	+	<i>C. albicans</i>
3	—	+ G	—	+ G	+	<i>C. albicans</i>
4	—	+ G	+	+ G	+	<i>C. albicans</i>
5	—	+ G	±	+ G	±	<i>C. albicans</i>
6	—	—	—	+ G	+	<i>C. krusei</i>
9N.C						
10N.C						
11N.C						
12	—	+ G	—	+ G	±	<i>C. albicans</i>
13	—	+ G	+ G	+ G	±	<i>C. tropicalis</i>
16N.C						
19	—	—	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i>
20	—	+ G	—	+ G	+	<i>C. albicans</i>
21	—	±	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i>
22	—	+ G	±	+ G	±	<i>C. albicans</i>
23	—	+ G	—	+ G	±	<i>C. albicans</i>
24	—	—	+	+	±	<i>C. guilliermondii</i>
25	—	+ G	—	+ G	±	<i>C. albicans</i>

Cepa Nº	Lactosa 1%	Maltosa 1%	Sacarosa 1%	Dextrosa 1%	Galactosa 1%	Especie
26	-	+ G	±	+ G	+	C. albicans
27	-	+ G	+ G	+ G	+ G	C. tropicalis
28	-	-	-	+ G	-	C. parakrusei
29	-	+ G	+ G	+ G	+	C. tropicalis
30	-	+ G	-	+ G	+	C. albicans
31	±	-	-	±	-	N.I.
32	-	+ G	-	+ G	+	C. albicans
33	-	+	-	+ G	+	C. albicans
34	-	±	+	+	±	C. guilliermondii
35	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
36	-	+ G	-	+ G	+	C. albicans
37	-	+ G	-	+ G	+	C. albicans
38	+	+	+	+	+	N.I.
40	-	±	+	+	±	C. guilliermondii
41	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
42	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
43	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
44	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
45	-	±	±	±	±	C. guilliermondii
46	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
47A	-	+ G	-	±	-	N.I.
47B	-	-	-	±	±	N.I.
48	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans
49	-	+ G	-	+ G	±	C. albicans

- : Reacción de fermentación negativa.

+ : Reacción de fermentación positiva.

± : Reacción de fermentación débil.

G : Producción de gas.

N.C : No creció en el medio de aislamiento

N.I : No identificada.

## CUADRO NUMERO 2

## REACCIONES DE ASIMILACION DE CARBONO

Cepa Nº	Lactosa	Maltosa	Dextrosa	Sacarosa	Galactosa	Eanol	Especie
	1% 48 h. 72 h.						
1a	[+]	[+]	+	+	+	+	[+] C. albicans
2b	- -	[ ]	[ ]	+	+	+	- - C. albicans
2	+	+	+	+	+	[+]	[+] C. albicans
3	- -	+	+	+	+	- [ ]	[+] C. albicans
4	- -	+	+	+	+	- -	C. albicans
5	- -	+	+	+	+	[ ]	[+] C. albicans
6	- -	- -	+	+	- -	- -	[+] C. krusei
9N.C							
10N.C							
11N.C							
12	-	[ ]	+	+	+	+	[+] C. albicans

Cepa Nº	<i>Lactosa</i>	<i>Maltosa</i>	<i>Dextrosa</i>	<i>Sacarosa</i>	<i>Galactosa</i>	<i>Etanol</i>	<i>Especie</i>	
	1% 48 h. 72 h.							
13	[+]	[+]	+	+	+	+	[+]	C. tropicalis
16N.C	-	[+]	+	+	+	+	-	C. guilliermondii
19	-	-	+	+	+	+	[+]	C. albicans
20	[+]	[+]	+	+	+	+	[+]	C. guilliermondii
21	-	-	+	+	+	+	[+]	C. albicans
22	-	-	+	+	+	+	[+]	C. albicans
23	-	-	+	+	+	+	[+]	C. albicans
24	[+]	[+]	+	+	+	+	[+]	C. guilliermondii
25	-	-	+	+	+	+	[+]	C. albicans
26	-	[+]	+	+	+	+	[+]	C. albicans
27	-	-	+	+	+	+	-	C. tropicalis
28	-	-	-	-	[ - ]	-	-	C. parakrusei

— 6 —

Cepa Nº	<i>Lactosa</i>		<i>Maltosa</i>		<i>Dextrosa</i>		<i>Sacarosa</i>		<i>Galactosa</i>		<i>Etanol</i>		<i>Especie</i>
	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	
29	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C. tropicalis
30	—	—	+	+	+	+	±	±	—	—	—	+	C. albicans
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N.I.
32	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C. albicans
33	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	C. albicans
34	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	C. guilliermondii
35	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	C. albicans
36	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C. albicans
37	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	C. albicans
38	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N.I.
40	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	C. guilliermondii
41	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	C. albicans
42	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	C. albicans

Cepa Nº	<i>Lactosa</i>		<i>Maltosa</i>		<i>Dextrosa</i>		<i>Sacarosa</i>		<i>Galactosa</i>		<i>Eanol</i>		<i>Especie</i>
	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	
43	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	<i>C. albicans</i>
44	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	<i>C. albicans</i>
45	—	+ <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">+ </span>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i>
46	—	—	+	+	+	+	[—] <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">— </span>	[—]	+	+	[+]	[+]	<i>C. albicans</i>
47A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N.I.
47B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N.I.
48	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	[+]	<i>C. albicans</i>
49	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	[+]	[+]	<i>C. albicans</i>

— : Reacción de asimilación negativa.

+: Reacción de asimilación positiva.

± : Reacción de asimilación débil.

□ : Variación con respecto a los patrones establecidos según clasificación convencional.

N.C. : No creció en el medio de aislamiento.

N.I. : No identificada.

De acuerdo con los datos obtenidos se identificaron:

- 25 cepas identificadas como especie *C. albicans*
- 1 cepa como especie *C. krusei*.
- 3 cepas como especie *C. tropicalis*.
- 6 cepas como *C. guilliermondii*.
- 1 cepa como *C. parakrusei*,

En caso de las cepas números: 31, 38, 47a y 47b, no se logró hacer su identificación.

#### COMENTARIOS:

Los resultados de las reacciones de fermentación practicadas a cada una de las cepas aisladas en cultivo puro están en la mayoría de los casos acordes con los datos establecidos, según la clasificación convencional.

- a) En algunas cepas pertenecientes a la especie *C. albicans* se obtuvieron 3 casos de reacciones débiles frente a la sacrosa y una cepa (cepa Nº 4) positiva frente al mismo carbohidrato.
- b) En caso de la cepa identificada como *C. krusei* se obtuvo reacción positiva frente a la galactosa; los resultados de las reacciones de fermentación frente a los otros azúcares están acordes con los datos bibliográficos.
- c) Los resultados de las reacciones de fermentación practicados con las cepas identificadas como *C. tropicalis* (cepas números 13 y 29) concuerdan con los datos bibliográficos. La cepa Nº 27 difiere con relación a los patrones, por la producción de gas frente a la sacarosa.
- d) Se obtuvieron reacciones débiles frente a la maltosa en caso de 4 cepas identificadas como *C. guilliermondii*; se presentó también en caso de la misma cepa una reacción débil frente a galactosa. Los demás resultados están acordes con los datos bibliográficos.
- e) Los datos de las reacciones de fermentación en caso de la especie identificada como *C. parakrusei* están acordes con la bibliografía.

f) No se logró en caso de las cepas números 31, 38, 47a y 47b hacer su clasificación por especies.

Comparando las reacciones de asimilación de carbono practicadas y recopiladas en el cuadro número 2 con los datos bibliográficos disponibles, se nota igualmente divergencia en algunos resultados.

a) En especies de *C. albicans* se anotaron reacciones positivas o positivas débiles con relación a la utilización de etanol igual que reacciones de utilización de lactosa positivas. Se encontró igualmente una cepa (cepa Nº 2b) no utilizadora de maltosa y 2 cepas (cepas números 46 y 49) no utilizadoras de sacarosa.

b) La cepa Nº 13 identificada como *C. tropicalis* mostró reacción de utilización positiva frente a la lactosa.

c) En caso de algunas cepas identificadas como *C. guilliermondii* se anotaron igualmente reacciones positivas con relación a la utilización de lactosa y una cepa (cepa Nº 40) negativa con relación a la utilización del etanol.

d) La cepa Nº 28 identificada como *C. parakrusei* presentó resultados negativos en cuanto a utilización de maltosa y sacarosa.

e) Con los resultados de las reacciones de fermentación y asimilación de carbono más los datos sobre características macroscópicas y microscópicas (18) no pudo hacerse identificación de las cepas números 31, 38, 47a y 47b.

### 3.3. Comprobación de la variación bioquímica presentada por especies de *Candida*.

Como resultados de las segundas reacciones de fermentación practicadas con el ánimo de confrontar los resultados y de comprobar la variación bioquímica en especies de *Candida*, habiéndose refrigerado las cepas durante dos meses a 8°C y mantenido invariables las otras condiciones de desarrollo se observó:

a) Variación evidente en caso de algunas especies de *Candida*, si se hace confrontación de los resultados obtenidos en las dos pruebas de fermentación.

b) En las cepas identificadas como *C. albicans*, en la mayoría de los casos se presenta variación con relación a la reacción frente al azúcar sacarosa presentándose las reacciones en el segundo

ensayo como positivas débiles, positivas y/o positivas con gas; hay también en algunos casos variación en los resultados con relación a la galactosa, dextrosa y en ocasiones maltosa.

c) La especie *C.krusei* muestra variación con relación al azúcar galactosa. Fue positiva en el primer caso y negativa en el segundo.

d) Dos de las tres cepas identificadas como *C.tropicalis* muestran variación frente al azúcar galactosa presentándose la reacción para la cepa N° 13 como positiva débil al cabo de 48 horas de incubación, en el primer caso, (cuadro N° 1) y positiva en el segundo caso (cuadro N° 3) al cabo de 48 horas; mientras que la cepa N° 27 presenta frente al mismo azúcar la reacción positiva con gas para el primer ensayo y positiva sin gas en el segundo ensayo.

La cepa N° 29, identificada también como *C.tropicalis*, muestra variación frente al azúcar maltosa presentándose inicialmente positiva con gas (cuadro N° 1) a las 48 horas y positiva en la segunda prueba (cuadro N° 3).

e) Las cepas *C.guilliermondii* presenta variación con relación a los azúcares: Sacarosa, dextrosa, galactosa y maltosa, cepa número 19; Sacarosa, cepa N° 21; maltosa, cepa N° 24; galactosa y sacarosa, cepa número 34; galactosa y sacarosa, cepa número 40; dextrosa y galactosa, cepa número 45.

#### 4. — DISCUSION

Se asevera (2), que las reacciones de fermentación son indispensables para la identificación de especies de *Candida* y las reacciones de asimilación "más definitivas"; sin embargo, según concepto personal, la identificación por especies de levaduras del género *Candida* tampoco podría realizarse meramente en base de éllas.

Confirmado los datos bibliográficos con los resultados de nuestro experimento, al igual que otras características, el comportamiento bioquímico de las *Candidas* está sometido a variaciones al parecer, por causas inherentes al microorganismo mismo o por factores extrínsecos conocidos o no. Las variaciones en el inóculo, el período de incubación, la temperatura, la variación en el medio

## CUADRO NUMERO 3

## REACCIONES DE FERMENTACION

37°C por 48 y 72 horas. - Cepas refrigeradas a 8°C, por dos meses.

Cepa N°	Lactosa		Maltosa		Dextrosa		Galactosa		Sacarosa		Especie	
	1%		1%		1%		1%		1%			
	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.	48 h.	72 h.		
1a	—	—	+G	+G	+	+G	+	+	±	±	C. albicans	
2b	—	—	—	—	+	+	+	+	±	±	C. albicans	
2	—	—	[+]	+G	+G	+G	+	+	±	±	C. albicans	
3	—	—	[+]	+G	+G	+G	+	+	±	±	C. albicans	
4	—	—	+	+G	+	+G	+	+	±	±	C. albicans	
5	—	—	+	+G	+	+G	[+]	+	±	+	C. albicans	
6	—	—	—	—	+1b	+G	[—]	—	—	—	C. krusei	

9N.C.

10N.C.

11N.C.

Cepa N°	Lactosa		Maltosa		Dextrosa		Galactosa		Sacarosa		Especie
	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	
12	-	-	[+]	+	[+]	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
13	-	-	+	+G	+G	+G	[+]	+G	+1b	+G	C. tropicalis
16N.C.											
19	-	-	[+]	[+]	[+]	+	[+]	[+]	[+]	+	C. guilliermondii
20	-	-	[+]	+	[+]	+1b	+	+	[+]	+G	C. albicans
21	-	-	[+]	[+]	+	+	+	+	+	+	C. guilliermondii
22	-	-	[+]	+	[+]	+G	[+]	+	[+]	+	C. albicans
23	-	-	[+]	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
24	-	-	[+]	+	+	+	[+]	+	+	+	C. guilliermondii
25	-	-	[+]	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
26	-	-	+G	+G	+G	+G	+	+	[+]	+	C. albicans
27	-	-	+G	+G	+G	+G	[+]	+	+G	+G	C. tropicalis

Cepa Nº	<i>Lactosa</i>		<i>Maltosa</i>		<i>Dextrosa</i>		<i>Galactosa</i>		<i>Sacarosa</i>		<i>Especie</i>
	1% 48 h. 72 h.										
28	- -	- -	+G +G	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	C. parakrusei
29	- -	+ +G	- -	+ +G	C. tropicalis						
30	- -	+G +G	- -	+G +G	+G +G	+G +G	- -	- -	- -	- -	C. albicans
31	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -	- -	+G +G	+G +G	N.I.
32	- -	+1b +G	- -	+ +G	C. albicans						
33	- -	+ +G	- -	+ +G	C. albicans						
34	- -	- -	+ +	+ +G	C. Guilliermondii						
35	- -	+G +G	- -	+G +G	+G +G	+G +G	+ +	+ +	- -	- -	C. albicans
36	- -	+ +G	- -	+ +G	+ +G	+ +G	+ +	+ +	- -	- -	C. albicans
37	- -	+G +G	- -	+G +G	+G +G	+G +G	+ +	+ +	- -	- -	C. albicans
38	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	N.I.
40	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	C. guilliermondii

Cepa Nº	Lactosa		Maltosa		Dextrosa		Galactosa		Sacarosa		Especie
	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	1%	48 h. 72 h.	
41	—	—	[+]	+	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
42	—	—	+G	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
43	—	—	[+G]	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
44	—	—	[+]	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	+	C. albicans
45	—	—	[+]	+	[+]	[+]	[+]	+	[+]	+	C. guilliermondii
46	—	—	[+]	+G	+G	+G	[+]	+	—	+G	C. albicans
47A	—	—	[+]	+G	[+]	+G	[+]	+	[+G]	+G	N.I.
47B	—	—	[+]	+1b	[+G]	+G	[+]	+	+G	+G	N.I.
48	—	—	+G	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans
49	—	—	+G	+G	+G	+G	[+]	+	[+]	[+]	C. albicans

— : Reacción de fermentación negativa.

+: Reacción de fermentación positiva.

± : Reacción débil.

□ : Variación de la reacción con respecto a las primeras reacciones anotadas en cuadro número 1.

N.C. : No creció en el medio de aislamiento.

N.I. : No identificadas.

1b : Una burbuja.

base utilizado para ello, la pureza o no de los compuestos utilizados en las pruebas bioquímicas, la destreza, criterio y concepto del operador, etc., podrían conducir a resultados diferentes y aún falsos con relación a los patrones establecidos, según la clasificación convencional.

Es notable observar cómo en nuestro experimento, la refrigeración de las cepas de levadura durante dos meses, a temperatura de 8°C, pudo influir tan notablemente como uno de los posibles factores inductores de variación, observándose en algunas especies frente a algunos azúcares reacciones variadas con relación a las observadas en el primer ensayo y con relación a los patrones convencionales establecidos.

Igualmente al comparar los resultados de las reacciones de asimilación practicadas, se nota divergencia fundamental con relación a los anotados como patrones para cada una de las levaduras, según la bibliografía.

Según concepto personal, solo la coordinación de muchos datos sobre aspectos muy diferentes de las Candidas pueden conducir a la determinación final de la especie. Existen patrones establecidos para las diferentes especies de *Candida* que caracterizan a cada una de ellas, pero, tampoco podrían tomarse como norma invariable en caso de trabajos sobre identificación de especies.

Parece ser, que aunque muy estudiadas las Candidas en aspectos muy diferentes y en especial en relación con su clasificación, aún reina duda y confusión, quedando aún mucho por hacer y definir en dicho campo.

Los estudios sobre composición antigénica y composición básica del DNA (ácido desoxirribonucleico) en caso de las Candidas podrán, al parecer, esclarecer y definir este aspecto tan importante de ellas, al aportar datos más definitivos sobre aspectos diferentes y básicos de estos microorganismos.

Siendo confusa y difícil la clasificación de las Candidas, y teniendo en cuenta que las Candidas pueden presentar marcadas variaciones bioquímicas, variaciones que se presentan "in vitro" pero que podrían posiblemente presentarse con mayor frecuencia "in vivo" donde las múltiples condiciones inherentes al huésped, a la fisiología del mismo, a sus condiciones inmunológicas, al sitio de la infección, a la duración de la misma, etc., podrían inducirlas, bastaría en diagnóstico clínico, cuando se trata de infecciones originadas por *Candida*, identificar solamente el género, dejando la

clasificación por especies para estudios sobre taxonomía, más detallados, o para aquellas investigaciones que requieren profundizar en tal aspecto.

### 5. — CONCLUSIONES

Del trabajo se concluye:

1. Entre 40 cepas de levaduras, aisladas de vaginitis o vulvovaginitis, 36 entre ellas pertenecientes al género *Candida* (18), se identificaron por especies:

25 Cepas como *C.albicans*.

1 Cepa como *C.krusei*.

3 Cepas como *C.tropicalis*.

6 Cepas como *C.guilliermondii*.

1 Cepa como *C.parakrusei*.

4 Cepas de levaduras no pudieron ser identificadas por los datos obtenidos acerca de éllas en el trabajo previo sobre características macro y microscópicas (18), y los resultados sobre comportamiento bioquímico.

2. Se comprobó la utilidad y necesidad de las reacciones de fermentación y asimilación para identificación de especies de *Candida*.

3. Se comprobó una vez más en base de nuestro experimento, que las *Candidas* pueden presentar también variación bioquímica, de donde la clasificación de las mismas no puede estar basada únicamente en el conocimiento de su comportamiento bioquímico.

4. Se estableció que la refrigeración en caso de cepas del género *Candida* puede ser un factor inductor de variación en las mismas.

5. Se comprobó la dificultad y confusión aún reinante acerca de la clasificación del género *Candida*.

6. Se comprobó que solo la coordinación de muchos datos sobre aspectos muy diferentes de las mismas pueden conducir a la determinación final de la especie.

7. Las experiencias obtenidas en el presente trabajo son base suficiente para continuar el estudio que fue el objetivo inicial del trabajo.

8. Aunque existen patrones establecidos que caracterizan las diferentes especies de *Candida*, no deben tomarse como norma invariable, en caso de diferenciación por especies de las mismas.

#### RESUMEN

Se hace el presente estudio para dar continuación a un trabajo inicial realizado, tendiente a la evaluación de algunos métodos macro y microscópicos disponibles para la clasificación del género *Candida* y como condición previa para la realización de un estudio posterior por el cual se pueda establecer la frecuencia relativa de las siete especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parakrusei* y *C. guilliermondii*) asociadas más frecuentemente con candidiasis en el hombre y en nuestro medio.

Se contempla aquí la parte referente a las pruebas bioquímicas más indicadas según la bibliografía, en clasificación de *Candidas*; se establece la utilidad o no de tales pruebas y se verifica la variación bioquímica presentada por las mismas.

Se utiliza, como inóculo 40 cepas de levaduras de origen vaginal o vulvo - vaginal (estudiadas inicialmente en cuanto a sus características macroscópicas y microscópicas) con las cuales se practican reacciones de fermentación y asimilación de carbono siguiendo métodos convencionales y se hace la verificación de la variación bioquímica que según bibliografía, es presentada por las mismas.

Se hace la discusión correspondiente y se concluye:

Que aunque muy necesarias las pruebas de fermentación y asimilación de carbono para la clasificación por especies del género *Candida*, tampoco pueden utilizarse dichos datos independientemente de otros datos adicionales sobre características macroscópicas y microscópicas dado que el reconocimiento y la diferenciación de las *Candidas* requiere de la coordinación de todos ellos siendo como es el género complejo y variable;

La variación bioquímica presentada "in vitro" puede igualmente presentarse "in vivo" donde las múltiples condiciones inhe-

rentes al huésped, a su fisiología, a su estado inmunológico, al sitio mismo de la infección, a la duración de la misma, etc., pueden actuar como agentes inductores de variación;

Dadas la controversia, dificultad y variaciones del género, en diagnóstico clínico y en caso de infecciones originadas por *Candida* puede ser suficiente la determinación del género;

En nuestro experimento la refrigeración por 2 meses a temperatura de 8°C de las cepas de *Candida* indujo variación bioquímica de las mismas;

Aún falta mucho por definir sobre la taxonomía de las *Candidas*, habiendo discrepancia al respecto.

#### SUMMARY

The present paper contemplates the aspect of the biochemical behaviour most frequently described in literature in relation with *Candida* species determination, as well as the variation which the genus may present in this behaviour.

The paper is the continuation of a previously realized investigation on macro and microscopic techniques usually employed for the identification of the genus as a previous condition for the establishment of the relative frequency of the different seven species of *Candida* most frequently associated with *Candida* infection in man, in our medium.

We used 40 strains of yeast isolated of vaginal or vulvo - vaginal secretions, previously studied in their macro and microscopic characteristics, investigating the commonly used methods of fermentation and assimilation as well as the variation in the biochemical behaviour.

From our results we may confirm the utility of the fermentation and assimilation reactions as the most important procedures for the determination of the species. We also may confirm the variation in the biochemical behavior of the species, and no matter how important these characteristics may be, in our experience they are not sufficient by themselves for the determination of species. The genus presents so much variation in shape, size physiology and biochemical characteristics that the observation of macro and microscopic aspects is necessary.

The biochemical variations which *Candida* species show *in vitro* might be also induced *in vivo* as a consequence of changes in

environmental conditions inheriting to the host, duration and localization of infection, etc.

Our experience states that refrigeration for two months at 8 degrees centigrade induces variation in chemical behaviour. Given the controversies in opinion, and the difficulty of classification, in clinical diagnostic of infection produced by *Candida* the identification of the genus may be sufficient.

There is still much to define upon classification of the genus *Candida*.

#### RÉSUMÉ

Nous avons entrepris une étude systématique du genre *Candida* dans le but d'évaluer la fréquence relative des diverses espèces associées à la candidiase humaine dans notre milieu. Cette levure présente sept espèces (*C. albicans*, *C. stellatoïdes*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parakrusei* et *C. guilliermondii*).

Dans cette seconde note nous présentons les résultats de l'étude critique des méthodes biochimiques préconisées pour la classification des espèces, dont nous avons vérifié par ailleurs la variabilité biochimique.

Nous avons utilisé quarante souches de levures d'origine vaginale ou vulvo - vaginale, dont nous avons étudié antérieurement les caractéristiques macro et microscopiques. Les cultures ont été soumises à l'épreuve de fermentation et à l'épreuve d'assimilation du carbone selon les méthodes conventionnelles.

Nos essais montrent que si ces méthodes sont nécessaires, elles sont néanmoins insuffisantes et ne peuvent être employées indépendamment des méthodes macro et microscopiques d'identification, par suite de la variabilité et de la complexité du genre.

Cette variabilité observée "in vitro" peut également se présenter "in vivo" où de multiples facteurs peuvent agir comme inducateurs, (physiologie de l'hôte, son état immunologique, le siège et la durée de l'infection, etc.).

Il est possible que, compte tenu des controverses et des difficultés inhérentes au genre, l'identification générique soit suffisante pour le diagnostic clinique des infections dues à ce parasite.

La réfrigération des souches durant deux mois à 8°C produit des variations biochimiques. Ce fait confirme qu'il y a encore beaucoup à faire du point de vue taxonomique.

6. — BIBLIOGRAFIA

1. STENDERUP, A. and LETH BAK, A. Deoxyribonucleic Acid-Base Composition of some species within the Genus Candida. *J. of Gen. Microb.*, 52: 231 - 236, 1968.
2. LODDER, J. and KREGER VAN RIJ, N. J. W., "The Yeast". A Taxonomic Study. North Holland Publishing Co. Amsterdam, 1952.
3. MURRAY, L. G. Some aspects of the Biochemical Differentiation of Pathogenic Fungi: a Review. *J. of G. Microbiol.* 52, 2: 213 - 222, 1968.
4. MARTIN, D. S. and JONES, C. P. Classification of Monilias *J. Bact.*, 39: 609, 1940.
5. AINSWORTH, G. G. and SUSSMAN, A. S. *The Fungi*, 3, Academic Press Inc., New York, 1968, 557 - 559.
6. COOK, A. H. "The Chemistry and Biology of the Yeasts". 3 Ed., Academic Press Inc., New York, 1968, 22 - 29.
7. SALTARELLI, C. G. Morphological and Physiological Variations between Sectors isolated from giant Colonies of *Candida albicans* and *C.stellatoidea*. *Micop. et Micol. Appl.* 34, 3 - 4: 209, 1968.
8. Ibid. 218.
9. MARTIN, D. S. et al. Practical Classification of the Monilias. *J. Bact.*, 34: 99, 1937.
10. COOK, A. H. *op. cit.*, 50 - 52.
11. TREVELYAN, W. E. et al. Detection of Sugars on Paper Cromatograms. *Nature*, 166: 444, 1950.
12. SUSUKI, S. and SUMAYAMA, H. Studies on the Antigenic activities of Yeasts. *J. Microbiol.*, 12: 413, 1968.
13. SUMMERS, D. F. et al. Polysaccharide Antigens of *Candida* Cell Well. *J. Inmunol.*, 92: 491, 1964.
14. CAMPBELL, I. and GILMOUR, R. H. Serological specificity of Yeast Mannan, *J. Gen. Microbiol.*, 59: 193 - 201, 1969.
15. DIFCO MANUAL. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 9<sup>th</sup> Ed., 1953, 238.
16. LETH KAK, A. and STENDERUP, A. Deoxyribonucleic Acid Homology in Yeasts. Genetic Relatedness with the Genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.*, 59: 21 - 30, 1969.
17. MARTÍN, 1942; TSUCHIYA et al. 1957 - 1959; SEELINGER, 1957 and TSUCHIYA, et. al., 1957; Citados por: AINSWORTH, G. C. and SUSSMAN, A. *op. cit.*, 607 - 613.
18. DE THEILKUHL CASTILLO, E. Estudio comparativo de algunos métodos macro y microscópicos para aislamiento y reconocimiento del género *Candida*. Depto. Formacia. U. Nal. Colombia, 1971.