

ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNOS METODOS MACRO Y MICROSCOPICOS PARA EL AISLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO DEL GENERO CANDIDA

ESTHER CASTILLO DE THEILKUHLL
Profesora Asistente del Departamento de Farmacia

INTRODUCCION

En el hombre, las infecciones por Candida ocurren en individuos de cualquier edad, sexo y condición social; sin embargo, aparecen más frecuentemente en niños de corta edad, en mujeres embarazadas, en personas que hayan sufrido de enfermedades como diabetes, tuberculosis, cáncer, linfomas malignos, etc. Los tratamientos con drogas que induzcan inmunodeficiencia y los tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro pueden favorecer o predisponer a las infecciones por Candida, igual que condiciones tales como la humedad frecuente de partes del cuerpo en personas cuyo oficio u ocupación lo requiera, lo mismo que sudoración profusa y continua en personas obesas, y en climas tropicales, predisponen al desarrollo de candidiasis dérmica y paroniquias. La infección puede ser aguda o crónica, localizada o sistémica, y puede —incluso— conducir a desenlace fatal (7, 8, 9, 10, 14, 22, 23, 24, 30, 31). La localización de la infección puede ser en la boca, el pulmón, la vagina y la vulva, las uñas, la piel, el intestino. Con frecuencia menor puede presentarse en el endocardio, la aorta, el riñón, las meninges. Puede ser causante de asma alérgicas y de infección sistémica (29, 30, 31). Las especies de Candida que más frecuentemente se han encontrado asociadas a la

infección en el humano son: C. albicans, C. krusei, C. pseudotropicalis, C. parakrusei, C. stellatoidea, C. guilliermondii y C. tropicalis, (14, 23).

Si bien en clínica suele bastar la identificación del género Candida como agente etiológico de una infección dada, no deja de tener interés la subclasificación en especies en función del sitio y el tipo de infección y de las condiciones del medio ambiental en particular.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA.

METODOS Y MEDIOS DE AISLAMIENTO Y DIFERENCIACION MAS CORRIENTE

Habitualmente la confirmación de la *Candida* se hace obteniendo primero su aislamiento en medios de uso corriente en microbiología, como agar-dextrosado o agar maltosado de Sabouraud, caldo de Sabouraud, etc. (34) adicionados o no de agentes tales como [penicilina, neomicina-sulfato, clortetraciclina, cicloheximida, cloranfenicol, etc. (12, 13, 33, 34, 35)] que permitan una mejor selección de las *Candidas* presentes en una muestra dada. Los medios anotados además de propiciar el aislamiento y crecimiento rápido de las *Candidas* brindan datos muy importantes tenidos en cuenta según bibliografía (15) en la clasificación convencional de este género de levaduras, como son las características macroscópicas o microscópicas del crecimiento.

Para apreciación de formación de clamidosporas, característica diferencial de algunas especies, según investigadores (4, 14, 19, 32), se aconsejan medios de agar-harina de maíz (38) adicionado o no de polisorbato 80 (5, 13), medio de Nickerson y Mankowski, con o sin polisorbato 80 (11, 13), agar extracto de arroz (40), agar-zeina (41), agar de Liu - Newton (13, 42), y agar bilis bovina (5). La utilización, en las condiciones correctas de cada uno de los medios de cultivo anotados, y con baja tensión de O_2 crearían un ambiente de inanición lo cual (5, 15) favorece el desarrollo de las clamidosporas, consideradas como formas de resistencia del microorganismo. El polisorbato 80 incrementa, según investigadores (5, 13) la producción de clamidosporas. Como técnicas auxiliares en la identificación de la especie *C. albicans* puede seguirse el método ideado por Weld (12) para observación de dos

tipos característicos de ramificación cuando se le cultiva a 37° C. por 18 horas, en ambiente de 10% de CO₂ y en medio de eosina-azul de metileno de Levine; también el método de Reynolds y Bande (6) para desarrollo de “tubos de germinación”, cuando se cultiva a las *Candidas* en plasma —o substitutos (28)— es aconsejada como auxiliar para identificación de las especies *C. albicans* y *C. stellatoidea*.

Se han reportado igualmente los resultados de pruebas realizadas con las especies antes mencionadas en ratones, los cuales inoculados en forma subcutánea y después de una hora de inyección muestran la formación de micelio. Otras especies del *Candida* son destruidas fácilmente por el tejido no presentándose el fenómeno de ramificación (6, 20).

Los datos macro o microscópicos obtenidos haciendo uso de los métodos y técnicas anotadas, o de buena parte de ellas, aunque suministran información muy importante en la identificación del género (excepcionalmente de la especie), en general son insuficientes e inconcluyentes cuando se trata de hacer diferenciación en especies. El género *Candida*, igual que otras levaduras, aunque aparentemente muy simple, presenta marcada variación en sus características fisiológicas, bioquímicas, patogénicas y morfológicas, presentándose a veces variaciones en sectores de la misma colonia (16).

Es indispensable, cuando se trata de identificar especies, el concurso de los datos sobre comportamiento bioquímico: reacciones de fermentación y asimilación de carbono, especialmente (2, 3, 4, 15, 17, 18, 19), como también asimilación de nitritos, formación de pigmentos, desdoblamiento de arbutina, requerimientos de vitaminas, desdoblamiento de líquidos, etc. (2, 15, 19).

Los estudios sobre composición básica del ADN (relación guanina/citosina), igual que sobre composición antigénica de algunas levaduras y en especial del género *Candida* incrementados últimamente, prometen despejar las dudas con relación a la ubicación taxonómica de las diferentes especies y a la relación entre ellas. (1, 21, 25, 26, 27, 36, 37).

2. PARTE EXPERIMENTAL.

El trabajo práctico se basó en el estudio de las características macroscópicas y microscópicas de 43 cepas de levaduras ais-

ladas a partir de muestras de origen vaginal o vulvo-vaginal, tendientes a la identificación del género *Candida*, como datos previos e indispensables para su diferenciación posterior en especies; en la comprobación, de la utilidad y efectividad de algunos métodos recomendados habitualmente para ello, y en la comprobación de la insuficiencia de dichos datos cuando se trata de hacer diferenciación en especies.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Toma de la muestra.

El ensayo experimental, en el presente trabajo, se hizo sobre 43 muestras de origen vaginal o vulvo-vaginal.

Las muestras fueron tomadas en solución salina isotónica estéril. Se procuró que no hubiese dilación de tiempo entre la toma de la muestra y el cultivo inicial dado que la *Candida* prolifera muy rápidamente y el número de microorganismos presentes en caso de infecciones originadas por *Candida* es un dato de gran valor diagnóstico.

2.2. Aislamiento, cultivo y reconocimiento del género *Candida* por métodos macro y microscópicos.

Para el aislamiento se utilizó agar glucosado de Sabouraud de la casa B.B.L., envasado en caja de Petri, adicionado de sulfato de neomicina en concentración de 50 mg. por 100 ml. de medio de cultivo.

El medio fue preparado siguiendo las indicaciones de la casa fabricante (43). Se practicó el método de siembra en estría sobre superficie. Las cajas fueron incubadas a 37° C. por 48 horas en la mayoría de los casos, o por 72 horas en caso de cultivos de desarrollo más lento.

Inóculo.

Se utilizó en todos los casos de siembra un asa en argolla, de 4 mm. de diámetro, de acero inoxidable de 0.46 mm. de diámetro.

Para cada cultivo se tomó como inóculo una asada de la muestra original en solución salina isotónica estéril.

A las 48 o 72 horas de incubación se procedió a hacer la observación macroscópica de los cultivos.

En la mayoría de los casos el antibiótico adicionado al medio de cultivo en la concentración indicada inhibió los otros microorganismos posiblemente presentes. En los casos en que se obtuvieron cultivos mixtos de levaduras y bacterias se procedió a hacer un nuevo subcultivo.

En caso de cultivos mixtos de levaduras, se procedió a aislarlas para obtener de ellas cultivos individuales.

Se hizo reconocimiento de las colonias en cuanto a su forma, tamaño, consistencia, aspecto y color.

Para la observación microscópica de las levaduras y otras estructuras adicionales, se utilizaron métodos de preparaciones en fresco empleando solución salina isotónica estéril o lactofenol, preparado en la forma usual, de acuerdo con los métodos corrientes aconsejados para la observación microscópica de estructuras de hongos (34).

Se utilizaron aumentos 10 x 7 y 97 x 7 para lo observación microscópica de las levaduras o estructuras adicionales (pseudomicelium, blastosporos, etc.); para la observación de los detalles microscópicos de las colonias se utilizaron aumentos 10x7 y 24x7.

2.3. *Cultivo en medio agar-maltosado de Sabouraud.*

A partir de los cultivos logrados en agar glucosado de Sabouraud, manteniendo en el mismo medio envasado en tubo, se hicieron cultivos ulteriores por el mismo método de siembra y en las mismas condiciones de desarrollo practicadas en caso del medio anteriormente anotado, en el medio de agar maltosado de Sabouraud, envasado en caja de Petri.

La observación macroscópica de los cultivos igual que la observación microscópica se realizó en forma idéntica a la anotada anteriormente para los cultivos en medio agar glucosado de Sabouraud.

Se hizo igualmente reconocimiento de las colonias en cuanto a su tamaño, forma, consistencia, aspecto y color.

2.4. *Cultivo en caldo de Sabouraud.*

Las cepas de levadura aisladas, fueron cultivadas en caldo de Sabouraud, para observación de características del crecimiento.

Inóculo.

Se suspendió una asada del crecimiento de cada una de las cepas de levadura mantenidas en medio agar glucosado de Sabouraud, tubo, en 2 ml. de solución salina isotónica estéril y de esta suspensión, previa agitación, se sembró 0.1 ml. en 7 ml. de medio de cultivo.

Los cultivos fueron incubados por 48 horas y observados después de este tiempo para su reconocimiento.

2.5. *Cultivo en medio eosina-azul de metileno de Levine* (adicionado de sulfato de neomicina) según la técnica de Weld.

Se procedió según el método de Weld (12) a hacer cultivos en medio de agar-eosina-azul de metileno de Levine (Difco), adicionado de sulfato de neomicina en concentración de 50 mg. por 100 ml. de medio de cultivo, los cuales fueron sembrados por el método de estría sobre la superficie e incubados a 37°C. por 18 horas y mantenidos en ambiente de 10% de CO₂ logrado con 7 ml. de H₂SO₄ al 5% y 1 g. de NaHCO₃, para un desecador de 2.500 ml. de capacidad, en el cual se introdujeron las cajas para su incubación.

Los cultivos fueron observados después de 18 horas de incubación con aumentos 10 x 7 y 24 x 7 para verificar el desarrollo o no de dos tipos de colonias con ramificaciones características, en caso de cepas de *C. albicans*, según observaciones de Weld (12):

a) Colonias con "micelio radiado": aparecen al microscopio como masas irregulares de células ovales, de las cuales nace el micelio que presenta en forma intercalar grumos pequeños de blastosporos y termina finalmente en hifas desnudas.

b) Colonias con "micelio plumoso", las cuales aparecen como masas de blastosporas y micelio, rodeadas por un fleco de filamentos miceliares largos que presentan al comienzo de la hifa verticilos de abundantes blastosporas, hasta aparecer ésta casi completamente desnuda.

c) Por este método, en la especie *C. stellatoidea* pueden desarrollarse ramificaciones bastante largas, en espiral y con pocas blastosporas, fácilmente diferenciables de las desarrolladas por la *C. albicans*.

Las otras especies de *Candida* no presentan los tipos de ramificaciones anotadas.

2.6. *Cultivo en plasma.*

Se practicó el método de cultivo en plasma obtenido en forma aséptica de sangre humana citratada (suministrada por el banco de sangre del Hospital Militar de Bogotá).

Se empleó el mismo tipo de inóculo usado en el caso de cultivos en medio de caldo de Sabouraud, y en la misma cantidad.

En cada tubo que contenía 3 ml. de plasma se sembró 0.1 ml. de inóculo. Se incubó en baño de maría a 37°C. por periodos de 2 y 18 horas, al cabo de los cuales se observó microscópicamente con aumentos de 10 x 7 y 24 x 7 para la búsqueda de posibles "tubos de germinación".

2.7. *Cultivo en agar-harina de maíz.*

A partir de los cultivos puros en agar glucosado de Sabouraud envasado en tubo, se procedió a hacer sub-cultivos en el medio de agar-harina de maíz (Difco).

Los cultivos fueron incubados a temperatura de 24°C. y observados microscópicamente con aumentos de 10 x 7 y 24 x 7 para la búsqueda de clamidosporas a las 24, 48 o 72 horas de incubación.

Como método de siembra se emplearon, el método de Benham (38), haciendo incisiones en el medio de cultivo, y el método de estrías suaves sobre la superficie del medio.

2.8. *Comparación de cuatro medios de cultivo para producción de clamidosporas.*

En caso de haber obtenido clamidosporas en el medio de agar-harina de maíz se procedió a hacer cultivos en el mismo medio adicionado de Tween 80 y en el medio de Nickerson y Mankowski (Chlamidospora agar, Bacto, Difco) adicionado igualmente de polisorbato 80 en proporción de 75 mg. por 100 ml. de medio de cultivo.

Se utilizó también el método de agar-bilis bovina (Oxgall, Bacto, Difco) con el mismo propósito.

El método de siembra en el medio de Nickerson y Mankowski, igual que en el medio de agar-bilis de buey fue el de siembra en estrías sobre la superficie.

El inóculo en el caso de los cuatro medios anotados fue igualmente tomado de los cultivos de las levaduras en medio de agar glucosado de Sabouraud, tubo.

Los cultivos en el medio de Nickerson y Mankowski, adicionado de polisorbato 80, fueron incubados a 25°C. por períodos de 24, 48 y 72 horas y observados microscópicamente con aumentos de 10 x 7 después de cada período de 24 horas de incubación.

Los cultivos en el medio de agar-bilis bovina fueron incubados a 25°C. por un período de 24 horas y examinados al microscopio para la búsqueda de clamidosporas.

3. RESULTADOS (resumidos en el cuadro número 1).

Nota: Aunque aquí se anotan los nombres de las especies de *Candida* para los diferentes tipos de colonias y características microscópicas en general, se necesitó tanto de éstos como de las características sobre comportamiento bioquímico, motivo de un trabajo que se publicará posteriormente, para hacer la identificación en especies; se anotan éstas para ilustrar cómo los métodos macro y microscópicos no son suficientes en la clasificación.

3.1. *Aislamiento.*

De 43 muestras recibidas de origen vaginal o vulvo-vaginal se aislaron 40 cepas de levaduras en cultivo puro, en medio de agar glucosado de Sabouraud, adicionado de sulfato de neomicina, en concentración de 50 mg. por 100 ml. de medio de cultivo.

En algunos casos el desarrollo del crecimiento fue lento necesitándose más de 48 horas de incubación a 37°C.

En 4 muestras no se observó crecimiento alguno, habiéndose practicado resiembras de la muestra en el mismo medio de aislamiento, no obteniéndose desarrollo. Se trataba posiblemente de vaginitis o vulvo-vaginitis originadas por otro tipo de microorganismo.

3.2. y 3.3. *Reconocimiento por métodos macro y microscópicos.*

Características del crecimiento en agar glucosado y agar maltosado de Sabouraud.

Se obtuvieron las siguientes características macro y microscópicas del crecimiento en los medios de agar dextrosado y agar maltosado de Sabouraud:

a) Colonias de color blanco, blanco crema o blanco grisáceo, con consistencia cremosa y algo lustrosa, levantadas, de 1.5 a 4 mm. diámetro, de forma regular y borde entero. (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parakrusei*).

b) Colonias blancas, planas, secas, opacas y confluentes. (*C. krusei*).

c) Colonias blancas o blanco-grisáceo, algo lustrosas, de 1 a 1.5 mm. de diámetro, levantadas, de borde entero y forma regular (*C. guilliermondii*).

d) Filamentación alrededor de las colonias después de 5 a 8 días de haberse mantenido los cultivos a temperatura de laboratorio (18 a 22°C.), (*C. albicans* y *C. tropicalis*).

e) Colonias de mayor tamaño (4-5 mm. de diámetro), bastante levantadas, de aspecto de vesícula, consistencia membranosa y muy filamentosas después de algunos días de mantenimiento a temperatura de laboratorio (cepa número 31 no identificada posteriormente).

De acuerdo a las observaciones microscópicas utilizando métodos de preparaciones en fresco de uso corriente en Micología (34), y con aumentos 10 x 7 y 97 x 7 se anotaron:

f) Formas unicelulares, grandes con brotantes o blastosporos en número de uno, dos, tres o más, a veces con pseudo-micelio, redondeados o elipsoidales. (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parakrusei*).

g) Levaduras de tamaño grande muy delgadas y alargadas. (*C. krusei*).

h) Formas de levadura, pequeñas, con desarrollo de blastosporos y pseudo-micelio (*C. guilliermondii*).

i) Formas de levadura muy grandes, redondeadas, elipsoidales o alargadas, con formación de verdadero micelio y con partición de las hifas para dar astrosporas (cepas N° 31, no identificada posteriormente).

3.4. Cultivo en caldo de Sabouraud.

Se presentaron cuatro formas de crecimiento en caldo de Sabouraud.

a) Crecimiento con sedimento, sin turbidez del medio, ni formación de anillo (*C. albicans*, *C. parakrusei*).

b) Crecimiento superficial con formación de anillo, burbujas y turbidez ligera del medio de cultivo (*C. tropicalis*).

c) Crecimiento superficial abundante y por las paredes del tubo dando una banda ancha, con turbidez del medio. (*C. krusei*).

d) Crecimiento con turbidez ligera y formación de un anillo no muy nítido (*C. guilliermondii*).

3.5. *Cultivo en medio eosina-azul de metileno*, adicionado de sulfato de neomicina, según método de Weld.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

a) Colonias con ramificaciones naciendo del centro de ellas, con verticilos de blastosporas abundantes inicialmente y más escasos al final de la hifa (*C. albicans*).

b) Ramificaciones saliendo de las colonias en forma radiada, con verticilos de blastosporos no muy abundantes, terminando en hifas casi desnudas (tipo menos encontrado perteneciente igualmente a la especie *C. albicans*).

c) Colonias sin ramificaciones (presentada por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parakrusei*, *C. guilliermondii*).

d) Colonias con ramificaciones semejando "palillos cruzados" (*C. krusei*).

3.6. *Cultivo en plasma*.

En cultivo en plasma humano se obtuvo producción de "tubos germinales" en caso de 23 cepas identificadas posteriormente como *C. albicans*. Cepas números: 1^a, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 20, 22, 23, 25, 26, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 41, 42, 46, 48 y 49.

Los cultivos se observaron microscópicamente a las 2 horas de incubación no habiéndose presentado aún filamentos; fueron observados de nuevo a las 18 horas de incubación.

3.7. *Cultivo en medio agar-harina de maíz*.

En medio agar-harina de maíz sin polisorbato 80 y por el método de estrías suaves sobre la superficie del medio o por incisiones en el agar se obtuvieron clamidosporas en 22 de las 40 cepas de levaduras aisladas en cultivo puro.

CUADRO NUMERO I — CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DEL CRECIMIENTO

ADS: agar dextrosado de Sabouraud
 AMS: agar maltosado de Sabouraud
 EAM: eosina-azul de metileno
 AHM: agar-harina de maíz
 Tw80: Tween 80
 ASB: agar-sales biliarres
 N—M: medio de Nickerson-Mankowski
 Tb. g. Pl.: tubos germinales en plasma

Cepa N°	Características de las colonias en ADS/neomicina y en AMS	Características microscópicas del crecimiento en ADS/neomicina y AMS	Ramific. EAM/neom. CO ₂	Clamidosporas				Características crecimiento caldo Sabouraud	Tb. g. Pl.	Especie
				AHM	AHM/Tw80	ASB	N-M Tw80			
1a	c-r-l-lu	e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
2b	c-r-l	e-bl-ps	×	---	---	---	---	sup. neg., sed.	—	<i>C. alb.</i>
2	c-l-lu	e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
3	c-l-r-lu	re-e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
4	c-l-r-lu	re-bl	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
5	c-l-lu-r	d-bl	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
6	ba-pl-s-i	d-peq-bl	×	—	—	---	---	anillo, turbidez sedimento	—	<i>C. krus.</i>
			dif.							
9	NC	NC								
10	NC	NC								
11	NC	NC								
12	c-r-l-lu	re-e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
13	ba-poco 1	re-e-bl-ps	—	---	---	---	---	sup. pos., sed., burbujas	—	<i>C. trop.</i>
16	NC	NC								
19	ba-peq	re-e-bl-ps	—	—	—	---	---	lig. turb., anillo poco nit.	---	<i>C. guill.</i>
20	ba-peq	peq-re-e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
21	ba-peq	re-e-bl-ps	—	---	---	---	---	lig. turb., anillo no caract., sed.	—	<i>C. guill.</i>
22	c-l-r	re-e-bl	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
23	c-l-r	re-e-bl	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
24	peq-l-c	peq-e-bl	—	---	---	---	---	lig. turb., anillo no muy nit., sedimento	—	<i>C. guill.</i>
25	ba-l-lu	re-e-bl	×	—	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
26	c-l-r	re-e-bl-ps	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
27	ba-r	re-e-bl	—	---	---	---	---	sup. pos., turb. anillo, burb.	—	<i>C. trop.</i>
28	peq-poco 1	peq-re-e-ps	—	---	---	---	---	sup. neg., sed.	—	<i>C. parakr.</i>
29	c-r-l	gr-re-e-bl-ps	—	---	---	---	---	sup. pos., anillo turb., burb.	—	<i>C. trop.</i>

Cepa Nº	Características de las colonias en ADS/neomina y en AMS	Características microscópicas del crecimiento en ADS/neomina y AMS	Ramific. EAM/ neom. CO ₂	Clamidosporas				Características crecimiento caldo Sabouraud	Tb. g. Pl.	Especie
				AHM	AHM/ Tw80	ASB	N-M Tw80			
30	c-l-lu	re-e-bl-ps	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
31	c-ma-l-fi	gr-e-mi-ar	dif.	—	—	—	—	sup. neg., turb. sed.	—	NI
32	c-l-lu	re-e-bl	—	×	×	×	×	sup. neg., lig. turb., sed.	×	<i>C. alb.</i>
33	c-l-lu	re-e-bl-ps	—	×	×	×	×	sup. neg., lig. turb., sed.	×	<i>C. alb.</i>
34	ba-r-peq	peq-e-bl-ps	—	—	—	—	—	sup. neg., lig. turb., sed.	—	<i>C. guill.</i>
35	c-l-lu	re-e-ps	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
36	c-l-lu	gr-re-bl-ps	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
37	c-l-lu	re-e-bl	—	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
38	ba-peq	peq-re-e-bl	—	—	—	—	—	turb., anillo	—	NI
40	ba-peq	peq-re-e	—	—	—	—	—	lig. turb., sed. anillo	—	
41	c-l-lu	re-e-bl	×	×	×	×	×	poco nit.	—	<i>C. guill.</i>
42	c-l-lu	re-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
43	c-l-lu	re-e-bl	—	—	—	—	—	sup. neg., sed.	—	<i>C. alb.</i>
44	c-l-lu	re-e-ps	—	—	—	—	—	sup. neg., sed.	—	<i>C. alb.</i>
45	ba-peq	peq-e-bl	—	—	—	—	—	lig. turb., sed., anillo	—	
46	c-l-lu	re-e-bl	—	×	×	×	×	poco nit.	—	<i>C. guill.</i>
47a	l-ru-c	al-bl	—	—	—	—	—	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>
47b	l-c	re-e-bl	—	—	—	—	—	NC	—	NI
48	ba-l	re-e-bl-ps	×	×	×	×	×	NC	—	NI
49	ba-l	re-e-bl-ps	×	×	×	×	×	sup. neg. sed.	×	<i>C. alb.</i>
			×	×	×	×	×	sup. neg., sed.	×	<i>C. alb.</i>

CONVENCIONES:

colonias:

c: crema
r: regular
l: levantada
lu: lustrosa
ba: blanca
pl: plana
s: seca
i: irregular
poco l: poco levantada
peq: pequeña
ma: mate
fi: filamentosa
ru: rugosa

características microscópicas:

e: elipsoidal
bl: blastosporas
ps: pseudomicelio
re: redonda
d: delgada
peq: pequeña
gr: grande
mi: micelio
ar: artrosporas

ramificaciones:

dif: diferentes

crecimiento en caldo de Sabouraud:

sup. neg.: crecimiento superficial negativo
sup. pos.: crecimiento superficial positivo
turb.: turbidez
lig. turb.: ligera turbidez
nit: nitido
burb.: burbujas

CONVENCIONES DE MEDIOS DE CULTIVO:

(Véase encabezamiento del cuadro número 1).

× = positivo
— = negativo
NC = no creció
NI = no identificada

Nota: Se anotan los nombres de las especies de *Candida* identificadas con ayuda de las características aquí anotadas y características del

Posteriormente se estableció que las cepas productoras de clamidosporas eran especie *C. albicans*.

3.8. Comparación de cuatro medios para clamidosporas.

En los cuatro medios para clamidosporas: agar-harina de maíz sin polisorbato 80, agar-harina de maíz con polisorbato 80, medio de agar-bilis bovina y medio de Nickerson y Mankowski adicionado de polisorbato 80 y practicando en los dos primeros medios el método de siembra en estría suave sobre la superficie y el método de incisión en el agar, según Benham, se obtuvo:

a) Desarrollo de clamidosporas en los cuatro medios utilizados para ello.

b) Mayor cantidad, según concepto personal, en los medios adicionados de polisorbato 80, a las 48 o 72 horas de incubación.

c) Mayor rapidez de desarrollo de clamidosporas (24 horas a 25°C.) y buen número de ellas en el medio de agar-bilis bovina.

d) Clamidosporas muy visibles microscópicamente, debido al color intenso que toman, por el colorante vital de azul tripan, después de 48 horas de incubación a 25°C.

e) No se observó variación en la cantidad de clamidosporas en los casos en que se practicaron los dos métodos diferentes de siembra, el método de Benham y el método de estrías suaves sobre la superficie.

Se hizo la observación microscópica de los cultivos con aumento 24 x 7 o con aumento 97 x 7 en preparaciones con solución salina isotónica y lactofenol.

4. DISCUSION.

Los resultados de esta experiencia práctica, en la mayoría de los casos muy satisfactorios y acordes con la bibliografía, solo permiten, salvo contadas excepciones, y según concepto personal, llegar hasta la comprobación del género. Para llegar hasta la identificación de especies se hacen indispensables los datos sobre comportamiento bioquímico.

Siendo los datos sobre características microscópicas celulares y características microscópicas del crecimiento de gran valor para la identificación de las *Candidas*, pero presentando dichos microorganismos aparentemente tan simples y muy similares entre

especies, variaciones muy marcadas, no solo en cuanto a sus caracteres fisiológicos, bioquímicos, antigénicos, sino también morfológicos, se necesitan datos adicionales para poder llegar hasta la identificación de especies.

Según van der Walt (32) hay producción de clamidosporas tanto en la especie *C. albicans* como en las especies *C. stellatoidea* y *C. parakrusei*; habiendo realizado cultivos en cuatro medios indicados para ello, con cada una de las 40 cepas de levadura aislados y habiendo hecho identificación posterior en especies, con ayuda de los resultados sobre comportamiento bioquímico (motivo de un segundo trabajo), se estableció que solo hay producción de clamidosporas en la especie *C. albicans*.

Los resultados logrados habiendo practicado la técnica de Weld (12): cultivo en eosina-azul de metileno de Levine (adicionado de sulfato de neomicina) y con ambiente de 10% de CO₂ e incubación a 37°C., lo cual favorece según el autor citado la formación de ramificación característica en el caso de *C. albicans*, confirman los resultados obtenidos por Weld. La técnica es según concepto personal, de gran utilidad como auxiliar en la identificación de la especie *C. albicans*.

Los resultados de los cultivos en plasma, según técnica de Reynolds y Brande (6) y verificación de otros (28) como ayuda para la identificación de la especie *C. albicans* y *C. stellatoidea* son muy similares a los anotados por los investigadores citados. En el presente experimento, como se comprobó una vez realizada la diferenciación en especies, 22 de las 25 cepas identificadas como *C. albicans* eran productoras de "tubos de germinación". La técnica anotada en concepto personal, merece consideración como ayuda en la identificación de *C. albicans*.

El medio de agar-harina de maíz, adicionado o no de polisorbato 80 ha sido ampliamente utilizado para la producción de clamidosporas, comprobándose en la mayoría de los casos su efectividad y utilidad.

Habiendo practicado en el presente trabajo comparación de cuatro medios de cultivo para producción de clamidosporas, agar-harina de maíz con polisorbato 80, agar-harina de maíz sin polisorbato 80, medio de Nickerson y Mankowski adicionado de polisorbato 80 y medio de agar-bilis bovina, se comprobó la eficacia de cualquiera de ellos siempre y cuando se realicen las pruebas en las condiciones aconsejadas para cada caso. Sin embargo los me-

dios adicionados de agentes tensio-activos, parecen incrementar el número de clamidosporas, posiblemente al crear un medio más hostil, ya que las clamidosporas se consideran como forma de resistencia del microorganismo.

El medio de agar-bilis bovina, incubado a 25°C. y por 24 horas, según concepto personal, se equipara favorablemente con el medio de agar-harina de maíz adicionado de polisorbato 80, o puede aventajarlo dado que se logra buena cantidad de clamidosporas en menor tiempo de incubación.

Los resultados con relación al medio de Nickerson y Mankowski adicionado de polisorbato 80, también pueden en concepto del presente autor, aventajar a los logrados en el medio agar-harina de maíz con polisorbato 80, al obtenerse buena cantidad de clamidosporas, las cuales toman el color vital de azul tripan que llevan el medio de cultivo, haciéndose muy fácilmente diferenciables al microscopio.

Según Benham (38), el método de cultivo haciendo incisiones en el agar crearía un ambiente de semi-anaerobiosis, lo cual incrementaría la producción de clamidosporas. Habiendo practicado dos métodos diferentes de siembra en el medio de agar-harina de maíz con y sin polisorbato 80, el método aconsejado por Benham y el método de estrías suaves sobre la superficie, no se notó diferencia en el número de clamidosporas.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se concluye:

1. Entre 43 muestras de origen vaginal o vulvo-vaginal sembradas, 4 no crecieron y de las 39 positivas se obtuvieron 40 cultivos de levaduras.
2. De los 40 cultivos puros pudieron identificarse 36 como *Candida*.
3. Se encontró producción de clamidosporas en 22 de los 40 cultivos de *Candida*. Los cultivos productores de clamidosporas, como pudo establecerse más adelante, pertenecen a la especie *C. albicans*.
4. Se comprobó la utilidad del método de Weld (cultivo en eosina-azul de metileno, según Levine, a temperatura de 37°C. y ambiente de 10% de CO₂), para la obtención de colonias con

ramificaciones características en caso de *C. albicans* como ayuda en la identificación de esta especie.

5. Se comprobó la utilidad del método de Reynolds y Brande para la obtención de “tubos de germinación” en caso de *C. albicans* como ayuda en la identificación de dicha especie.
6. Se comprobó la utilidad de los medios agar-harina de maíz, agar harina de maíz con polisorbato 80, medio de Nickerson y Mancowski adicionado de polisorbato 80 y medio de agar-bilis bovina para producción de clamidosporas, como auxiliar de identificación de la especie *C. albicans*.
7. Entre los medios agar-harina de maíz con polisorbato 80 y agar-bilis bovina (incubado a 25°C. por 24 horas) se encontró más favorable este último para producción de clamidosporas al lograrse una buena cantidad de ellas en menos tiempo.
8. Se encontró el medio Nickerson y Mankowski con polisorbato 80 más favorable que el medio agar-harina de maíz igualmente adicionado de polisorbato 80, al permitir la producción de clamidosporas muy diferenciables al microscopio, por el color vital de azul tripan que lleva el medio.
9. Además de las características macro o microscópicas del crecimiento en agar dextrosado de Sabouraud, agar maltosado de Sabouraud y caldo de Sabouraud, los datos positivos obtenidos con relación a la formación de ramificaciones, según Weld, de “tubos de germinación” según Reynolds y Brande y de clamidosporas, en los medios indicados para ello, sugieren la posibilidad de encontrarse frente a la especie *C. albicans*.
10. Se comprueba que si bien para identificación del género *Candida* son suficientes los datos sobre características macro y microscópicas del crecimiento siguiendo los métodos aconsejados para ello, éstos son insuficientes e inconcluyentes cuando se trata de hacer diferenciación en especies.

APENDICE

(Medios de cultivo y otros elementos utilizados)

Agar glucosado de Sabouraud

(Casa B. B. L., Nº 01-131)

Agar maltosado de Sabouraud

(Casa B. B. L., Nº 01-142)

Caldo de Sabouraud

(Casa B. B. L., N° 01-296)

Agar-harina de maiz

(Casa Difco, N° B-386)

Medio de Nickerson y Mankowski

(Bacto, clamidospora-agar) (Casa Difco)

Agar-bilis de buey

Oxgall (Bilis de buey) Difco

Agar (Bacto) Difco

Bacto E. M. B.

AGAR (N° B-76 Casa Difco)

Neomicina-sulfato

de la casa Siemsgluss and Sohn

(2000 Hamburg 36 P. O. Box 163 Germany)

Tween 80 (polisorbato 80)

de la Casa Atlas Powder Company (U.S.A.)

La sangre citratada

fue suministrada por el Banco de Sangre del Hospital Militar Central de Bogotá.

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Foto N° 1. Colonia tipo "radiado".

Cultivo de *C. albicans* en medio de eosina-azul de metileno según el método de Weld. Cultivo de 18 horas. Aumento 24 x 7.

Foto N° 2. Colonia tipo "plumoso".

Cultivo de *C. albicans* en medio eosina-azul de metileno según la técnica de Weld. Cultivo de 18 horas. Aumento 24 x 7.

Foto N° 3. Colonia sin ramificación.

Cultivo en medio eosina-azul de metileno, según la técnica de Weld. Colonia presentada por *C. albicans*



Figura No. 1



Figura No. 2

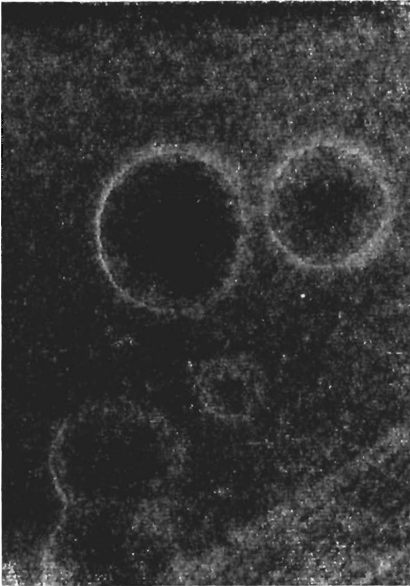


Figura No. 3

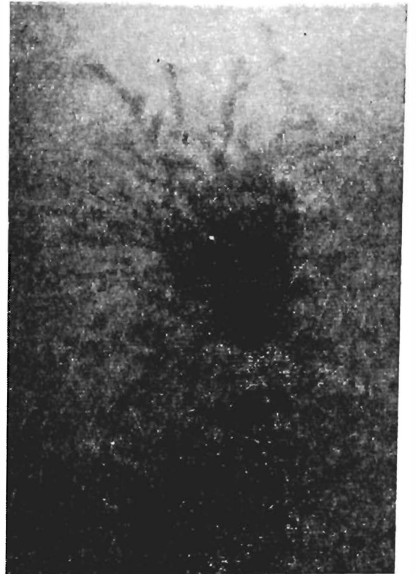


Figura No. 4

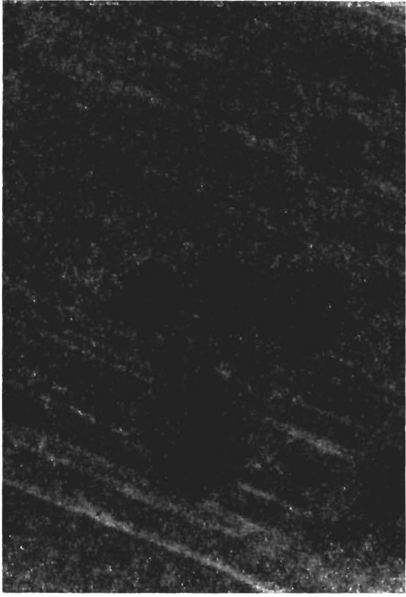


Figura No. 5

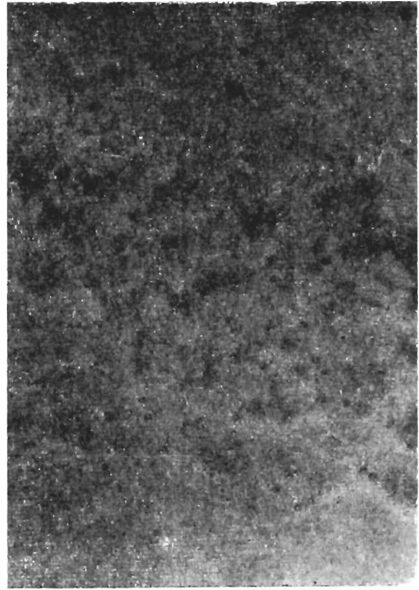


Figura No. 6

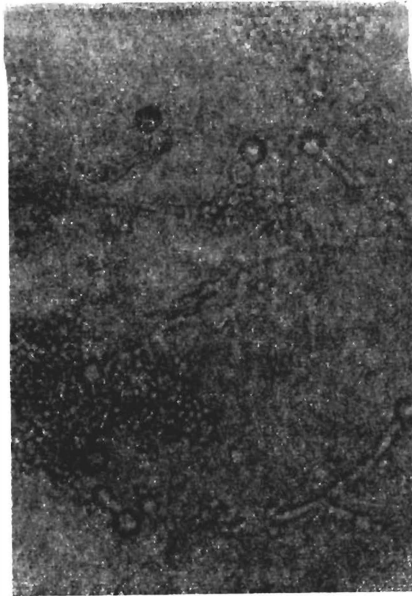


Figura No. 7

y otras especies de *Candida*. Cultivo de 18 horas. Aumento 24 x 7.

- Foto N° 4. Colonia "estrellada" y con clamidosporas en medio de agar-harina de maíz con polisorbato 80. Aumento 24 x 7.
- Foto N° 5. Clamidosporas en el medio de agar-bilis bovina. Cultivo de 24 horas a 25°C. Aumento 24 x 7.
- Foto N° 6. Clamidosporas en medio Nickerson y Mankowski, con polisorbato 80. Cultivo de 48 horas a 25°C. Aumento 24 x 7.
- Foto N° 7. Clamidosporas vistos en preparación en fresco con azul de eastofenol. Aumento 97 x 7 e inmersión en aceite.

RESUMEN

Dadas la confusión y las controversias que aún reinan acerca de la clasificación del género *Candida* en especies y como condición previa para un ulterior estudio de la incidencia relativa de las diferentes especies en las infecciones candiadiásicas comunes en el hombre en nuestro medio, se procedió a un estudio comparativo de los métodos habituales de aislamiento de *Candida* y su diferenciación en especies mediante la observación de las características morfológicas macro y microscópicas en su desarrollo en diferentes medios de cultivo. Con este fin se estudiaron las características de desarrollo macroscópicas de cepas de origen vaginal o vulvo-vaginal, en los medios corrientes de aislamiento, agar dextrosado de Sabouraud, agar maltosado de Sabouraud y caldo de Sabouraud, así como las características microscópicas en estos mismos medios, y en los medios específicos para producción de clamidosporas: agar-harina de maíz con y sin polisorbato 80, medio de Nickerson y Mankowski con polisorbato 80 y medio de agar-bilis bovina; al igual que las características microscópicas obtenidas en el medio de eosina-azul de metileno de Levine (siguiendo la técnica de Weld), conducente a la formación de colonias con dos tipos de ramificaciones características en la especie *C. albicans*, y en plasma humano, conducente a la formación de "tubos germinales". Los resultados obtenidos concuerdan en su mayor parte con los datos bibliográficos disponibles, pero demuestran nuevamente que, dada

la variación y complejidad de este género de levaduras, solamente son suficientes para la identificación del género, mas no para su diferenciación en especies.

Para ello es indispensable complementar los datos referentes a las características morfológicas con el estudio del comportamiento bioquímico.

SUMMARY

The initial purpose of this investigation was to determine the relative frequency of the incidence of each of the common species associated with infections by *Candida* in man in our medium. In spite the many investigations which have been done in the field of the classification of the genus *Candida* there persist confusion and controversy. This induced us to review first of all the main techniques suggested by other investigators which are commonly used as guides for the classification of the genus *Candida* and some other yeasts and to make it the subject of this investigation.

In the experimental part isolates of yeasts were obtained from vaginal and vulvo-vaginal secretions. The macroscopic and microscopic characteristics of the growth on the ordinary media: Sabouraud-dextrose-agar, Sabouraud maltose-agar and Sabouraud liquid media were studied, as well as the microscopic characteristics of the yeasts. The production of chlamydo spores was also tested in three different media: corn-meal-agar, corn-meal-agar with Tween 80, Nickerson and Mankowski medium with Tween 80 and oxgall-agar medium. The yeasts were also cultured on the eosine-methylene-blue medium of Levine practicing the Weld's technique for the production of two different type of ramifications for *C. albicans*. Additionally, the cells were cultured in plasma according to the Reynolds and Brande's technique for the production of "germinal tubes" for *C. albicans* and *C. stellatoidea*.

The results are generally in accordance with those reported in the bibliography and confirm that no matter how important the macroscopic and microscopic characteristics are, they are not conclusive by themselves for the identification of the species due to the variability of the yeasts, been there indispensable the additional study of their biochemical behavior for the differentiation of species.

R É S U M É

Vu les controverses et la confusion qui régnent encore actuellement au sujet de la classification du genre *Candida* et comme condition préliminaire à la détermination de l'incidence relative des diverses espèces sur les affections communes aux habitants de notre région, on a effectué une étude comparative des méthodes usuelles d'isolement et de différenciation des espèces de *Candida* au moyen de ses caractères morphologiques macro et microscopiques observés durant son développement dans différents milieux de culture.

Les caractéristiques macroscopiques du développement de souches d'origine vaginale o vulvo-vaginale ont été étudiées dans les milieux usuels d'agar dénaturé de Sabouraud, agar maltose de Sabouraud et bouillon de Sabouraud. Les caractéristiques microscopiques ont été étudiées dans ces mêmes milieux, et en plus, dans les milieux spécifiques pour la production de Clamidospores: agar-farine de maïs avec et sans polisorbate 80, milieu de Nickerson et Mankowski avec polisorbate 80, et agar-bile de bovin. Finalement on a étudié les caractéristiques microscopiques des cultures sur éosine-bleu de méthylène de Levine (Technique de Weld) et sur plasma humain. Les premières produisent des colonies avec deux types de ramifications spécifiques de *C. albicans*, tandis que les secondes conduisent à la formation de "tubes germinaux".

Les résultats obtenus concordent dans la plupart des cas avec les données de la littérature disponible; cependant, ils confirment une fois de plus que par suite de la variation et de la complexité du genre, les méthodes classiques permettent bien l'identification du genre, mais sont toutefois insuffisantes pour la différenciation des espèces. Les essais morphologiques doivent se compléter par l'étude du comportement biochimique.

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

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 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. FISHER JOHN B. and KANE, J.: *Production of Clamydospores by Candida albicans cultivated en dilute Oxgall-Agar*. Micop. et Mycol. Appl., 35: 3-4: 223-229, 1968.
6. REYNOLDS Y BRANDE (1956), citados por: KAMAYA, T., M. D.: *Simple Rapid Identification of Candida albicans with emphasis on diferenciación between Candida albicans and Candida stellatoidea*. Mycop. et Micol. appl. 35, 2: 105-111, 1968.
7. SENECCA, H.: *et al., Candida, pyelonephritis and Candiduria: The clinical significance of Candida albicans in urine cultures*. J. Urol., 100: 226-269, 1968.
8. SPITZBART, H.: *The Clinical form of Vaginal Micosis*. Gynaecologia, 165: 295-300, 1968.
9. MARSTEN, J. L.: *et al., Aortitis due to Candida stellatoidea developing in a Supraavalvular sutureline*. Ann. Thorac. Surg., 7: 134-138, 1968.
10. ITKIN, I. H.: *et. al., Asthmatic allergies. Candida albicans as an atopic Allergen*. J. Kansas. Mod. Soc., 69: 483-486, 1968.
11. NICKERSON, W. J. and MANKOWSKI, Z.: *A Polisaccharide medium of known composition favoring Chlamyospore formation in Candida albicans*. J. Infect. Dis., 92: 20-25, 1953.
12. WELD, J. T.: *Candida albicans: Rapid identification in pure culture with Carbon Dioxide on Modified Eosin- Metnylene Blue medium*. A. M. A. Arch. and Syph., 66: 691-694, 1952.
13. DIFCO, *Supplementary Literature*. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 1964, 57.
14. EMMONS, C. W., BINFORD, CH. and UTZ, J. P.: *"Medical Mycology"*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1964, 141.
15. COOK, A. H.: *"The Chemistry and Biology of the Yeasts"*. 3 Ed., Academic Press Inc., New York, 1968, 22-29.
16. SALTARELLI, C. G.: *Morphological and Physiological Variations between Sectors isolated from giant Colonies of Candida albicans and C. stellatoidea*. Mycop. et Micol. Appl., 34: 3-4: 209, 1968.
17. *Ibid.* 218.
18. MARTÍN, D. S.: *et. al., Practical Classification of the Monilias*. J. Bact., 34: 99, 1937.

19. COOK, A. H.: *op. cit.*, 50-52.
20. HILL, W. D. and GEBHART, L. P.: *Morphological transformation of Candida albicans in Tissue of Mice*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92: 640-644, 1956.
21. SALTARELLI, C. G.: *Immuno-electrophoresis to detect differences between strains of Candida albicans*. Mycop. et Mycol. Appl., 34: 3-4: 226-233, 1968.
22. ZAPATER, R. C.: "Atlas de diagnóstico Micológico". 2ª Ed., El Ateneo, Buenos Aires, 1965, 104.
23. CONNANT, N. F. MARTIN, D. S. and SMITH, D. T.: *Manual of Clinical Mycology*. Saunders Co., Philadelphia, 1944, 138-140.
24. SMITH Y MARTIN: *Bacteriología de Zinsser*. 2 Ed., Uthea, México, 1964, 963.
25. TREVELYAN, W. E.: *et. al.*, *Detection of Sugars on Paper Chromatograms*. Nature, 166: 444, 1950.
26. SUSUKI, S. and SUMAYAMA, H.: *Studies on the Antigenic activities of Yeasts*. J. Microbiol., 12: 413, 1968.
27. SUMMERS, D. F.: *et al.*, *Polysaccharide Antigens of Candida Cell Wall*. J. Immunol., 92: 491, 1964.
28. TASCHDJIAN, C. L.: *et. al.*, *Rapid Identification of Candida albicans by Filamentation on Serum and Serum substitutes*. A. M. A. J. Dis. Child., 99: 212-215, 1960.
29. AINSWORTH, G. C. and SUSSMAN, A. S.: *The Fungi*. Academic Press, New York, 1968, 3: 214-215.
30. COOK, A. H.: *op. cit.*, 592-593.
31. DAVIS, DULBECCO, EISSEN, GINSBERG and WOOD: "Microbiology". 4 Ed., Harper and Row, New York, 1968, 996-997.
32. WALT, J. P. VANDER.: *On the Yeast Candida pulcherrima and its pigment*. Thesis. Delft, 1952.
33. DIFCO MANUAL: *Difco Laboratories*. Detroit, Michigan, 9ª Ed., 1953, 238.
34. ZAPATER, R. C.: *op. cit.*, 28-32.
35. KORZYBSKI, T., KOWSYK - GINDIFER, Z., KURYLOWICZ, W., "Antibiotics". 1ª Ed., PWN - Polishscientific Publishers, Warszawa, 1967, I: 846.
36. LETH KAK, A. and STENDERUP, A.: *Deoxyribonucleic Acid Homology in Yeasts*. Genetic Relatedness with the Genus Candida. J. Gen. Microbiol., 59: 21-30, 1969.

37. MARTIN, 1942; TSUCHIYA et. al., 1957-1959; SEELIGER, 1957 and TSUCHIYA, et. al., 1957; Citados por: AINSWORTH, G. C. and SUSSMAN, A., *op. cit.*, 607-613.
38. BENHAM, R. W.: *Certain Monilias parasitic on Man; their identification by morphology and by agglutination*. J. Infect. Dis., 49: 183, 1931.
39. Kligman, A. M.: *Aids in technic in the Identification of C. albicans*. J. Invest. Derm., 14: 173-176, 1950.
40. TASCHDJIAN, C. L.: *Routine identification of C. albicans*. Current methods and a new medium. Mycol., 49: 332-337, 1957.
41. REID, J. D., JONES, M. M. and CARTER, E. B.: *A simple clear medium for demonstration of Chlamydo spores of C. albicans*. Am. J. Clin. Path., 23: 938-941, 1953.
42. LIU, P, y NEWTON, A.: *Medio para Chlamydo sporas en C. albicans*. A. J. Clin. Path., 25: 93, 1955.
43. *B. B. L. Manual "Productos para Laboratorios de Microbiología"*. Baltimore. Biological Laboratory, Inc. Colón, Panamá, 1959.