

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

20

Adq. \_\_\_\_\_

Titulo \_\_\_\_\_

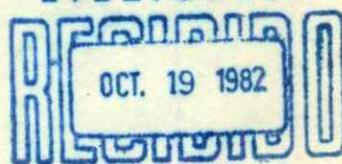
As. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

REVISION BIBLIOGRAFICA  
 SOBRE EL DIAGNOSTICO  
 MICROBIOLOGICO DE --  
 CANDIDIASIS VAGINAL

FACULTAD DE QUIMICA  
 BIBLIOTECA



U. A. Q.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO BIOLOGO

PRESENTA

SILVIA UGALDE TREJO

FACULTAD DE  
 QUIMICA



BIBLOTECA

QUERETARO QRO.

OCTUBRE 1982

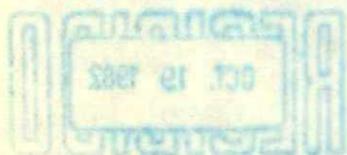
No. Adq. 150577

No. Titulo TS

Glas. 576.165

U26r

FACULTAD DE QUIMICA  
BIBLIOTECA



U. A. U.



BIBLIOTECA

AL CREADOR: Por siempre haber estado ahí,  
atras de todo.

A MIS PADRES:

MA. DEL CARMEN TREJO DE UGALDE

MIGUEL UGALDE NAVARRETE

En agradecimiento al apoyo, al cariño  
y a la confianza que siempre deposita  
ron en mí.

A SERGIO:

Por el ejemplo que siempre he tenido  
de tí.

A MANUELITO:

Con mucho cariño.

A MIS MAESTROS:

Mi agradecimiento por sus enseñanzas durante el transcurso de carrera.

AL Q.F.B. JORGE C. H. DE DIEGO:

Como muestra de agradecimiento por su orientación y colaboración, para la realización de este trabajo.

A MIS COMPANEROS DE ESTUDIOS:

"Recojan los frutos de la semilla sembrada".

AL PERSONAL DEL LABORATORIO GABAT:

Por la confianza y amistad que han depositado en mí.

AL GRUPO DE ORACION DEL SALESIANO Y  
EN ESPECIAL AL PADRE JAVIER MARTINEZ

Por enseñarme donde encontrar la  
fuerza para seguir adelante.

A: LILIA Y TERE

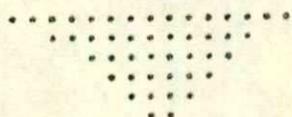
Por todo lo que nos une.

A TODOS MIS AMIGOS

# I N D I C E .

	Pags.
PROLOGO .....	1-2
INTRODUCCION .....	3-4
HISTORIA .....	5-7
CLASIFICACION.....	8-9
SINONIMIA.....	10-12
GENERALIDADES:	
- DESCRIPCION DE LA ENFER-	
DAD .....	13-14
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	14-15
DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	16
- FUENTE DE INFECCION.....	16-17
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:	
- TOMA DE MUESTRA .....	18-19
- EXAMEN DE LABORATORIO .....	19
- EXAMEN DIRECTO .....	19-21
- METODOS DE CULTIVO.	
1) AGAR GLUCOSA DE SABOU-	
RAUD .....	21-23
INVESTIGACION DE CANDI	
DA EN MATERIA FECAL.....	23-24
CULTIVOS CUALITATIVOS	
Y CUANTITATIVOS.....	24-25
II) CALDO GLUCOSADO DE SA-	
BOURAUD.....	25-26
III) AGAR SANGRE.....	27-29

	Pags.
VI) AGAR HARINA DE MAIZ.....	29-35
VIII) GERMINACION EN TUBO .....	35-37
IX) AGAR LEVINE CON EOSINA Y AZUL DE METILENO.....	38-39
-INOCULACION ANIMAL.....	39
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LAS ESPECIES DE CANDIDA.....	40-42
OCURRENCIA SAPROFITA.....	43
PATOLOGIA.....	44
TRATAMIENTO .....	45-48
CONCLUSIONES .....	49
BIBLIOGRAFIA .....	50-53



## P R O L O G O

Con el invento del microscopio por Antón Van Leeuwenhoek, la humanidad comenzó a interesarse en conocer el curioso y apasionante mundo de aquellos seres microscópicos, causales del origen de diversas enfermedades. Durante el tiempo que precedió a Pasteur, los microorganismos fueron aceptados como curiosidades extrañas dignas exclusivamente de admiración, sin tener en cuenta que tenían participación activa en los padecimientos; los trabajos desarrollados por él, dieron a tales, la real importancia del papel que desempeñan en la vida animal. A partir de entonces, comenzó una intensa tarea de investigación, cuyos estudios forman en la actualidad la Ciencia de la Microbiología.

Como parte de esta Ciencia, sobresale importantemente, una de sus más importantes y poco conocidas ramas: La Micología.

El presente trabajo, pretende conformar una recopilación bibliográfica somera, acerca de una levadura, perteneciente al género *Candida*; del cual se estudiará su incidencia en la cavidad vaginal. Con tal objeto se presentarán además, las técnicas de laboratorio para su conocimiento, mediante las

cuales es posible llegar al diagnóstico de tal micosis.

Deseo agradecer la generosa ayuda del Químico Farmacobiologo J. Carlos Hernández y de Diego, Catedrático titular del curso de " Técnicas aplicadas y nuevos avances en Microbiología Médica ", que se llevó a cabo como opción para recibir el título profesional; y que además funge como guía técnico-teórico de este estudio de tesina.

## I N T R O D U C C I O N

La candidiasis vaginal, causada por especies de Candida, comunmente Candida albicans, es una infección aguda o subaguda de la mucosa vaginal que se caracteriza por: enrojecimiento de las paredes de la vagina, prurito intenso y secreción.

Es una de las micosis más frecuentemente observadas. Esto es particularmente cierto en la categoría de infecciones oportunistas. Forma parte de la flora normal de la cavidad bucal, intestino grueso y, de la vagina. En circunstancias ordinarias, queda inhibido por las defensas corporales normales y otros elementos de la flora normal.

Los cuadros clínicos producidos por estos hongos son muchos y muy dispares. Entre ellos se incluyen el muguet oral y lesiones micóticas de otras mucosas como vaginitis (tema central de estudio), bronquitis, esofagitis; lesiones cutáneas y onicomiasis, procesos broncopulmonares, digestivos (enteritis), generalizados septicémicos con endocarditis, meningitis y hasta osteomielitis cerebral (Wegmann).

Actualmente, se ha registrado un gran aumento en la frecuencia de infecciones por este tipo de

hongos debido al continuo uso de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides y drogas citotóxicas. Estos agentes disminuyen la resistencia de los tejidos y alteran la flora microbiana normal, factores que favorecen el desarrollo y patogenicidad de la Candida, pasando de esta forma del estado saprófito al patógeno.

El organismo presenta un tipo de dimorfismo relacionado con la nutrición. En condiciones de un crecimiento favorables y en presencia de carbohidrato fermentable, crece como una levadura en gemación. En medios sin carbohidrato fermentativo, y en condiciones semianaerobicas, o cuando el contenido de nitrógeno es elevado, la levadura se alarga formando un pseudomicelio, y un micelio acompañado de la producción de blastosporas y clamidosporas. La formación del pseudomicelio y micelio es un índice de colonización del tejido. La aparición de las formas en levadura, suele significar existencia saprófita. La presencia de ambas, levaduras y micelio, en esputo, sangre, orina y heces, indica colonización.

## H I S T O R I A

En la antigüedad Hipócrates observó que algunos recién nacidos tenían la lengua cubierta de una pasta blanca, el conocido "muguet". Denomino esta enfermedad estomatitis aftosa.

Como dermatofitosis, la candidiasis data desde los propios comienzos de la Microbiología. En 1839 fueron descritos por primera vez, los hongos ó levaduras por Schoenlein al descubrirse el hongo causante del favus (padecimiento del cuero cabelludo), y en ese mismo año B. Lagenbeck describió el microorganismo que produce el afta el cual es semejante a una levadura.

En 1842 Gruby describió ante la Academia de Ciencias de París el hongo que causa " la verdadera alteración de las mucosas en los niños. En 1853 Charles Robin estableció que la afección de la mucosa bucal conocida con el nombre de " muguet " , era debida al parasitismo de un hongo que denominó *Oidium albicans*. Durante los primeros tiempos fue discutido su papel etiológico en los procesos de que se aislaba.

Louis Mayer describió vulvitis micótica en 1862. F. Von Winckel en 1866 estudió los parásitos

de la vagina de la mujer embarazada, además inoculó la vagina de conejas produciéndose un leve enrojecimiento.

D. Hausman estudió sobre los parásitos que afectan a los genitales escribiendo sobre Oidium - albicans y micosis vaginales, inoculó a una embarazada cuya vagina era normal con mucosa tomada directamente de la vagina de otra paciente con vulvovaginitis micótica, produciéndose inflamación vaginal y prurito vulvar. O. Von Herif sostuvo que la vaginitis micótica era más común en ciudades, que en los medios rurales.

Berkhout transfirió las especies de hongos que desarrollan pseudomicelio y se reproducen por gemación al género Candida. Durante las primeras dos décadass de este siglo los estudios de Castellani en 1905 lo llevaron a descubrir en Ceilán procesos de tipo broncopulmonar provocados por C. albicans; y las observaciones de Ashford de su constante presencia en el sprue tropical son notables. Usualmente la C. albicans puede causar enfermedad bronquial o pulmonar solamente en pacientes ya debilitados o vueltos susceptibles a causa de otra enfermedad. Es sólo de importancia secundaria en el sprue tropical.

La elevada colonización del tracto superior respiratorio y oral por este hongo notable y fácil

mente aislado como levadura, dió considerable impe  
tu a la Micología Médica durante sus inicios. La u  
bicuidad, adaptabilidad, y patogenicidad de la Can-  
dida albicans y sus especies relacionadas, en la  
presente era de los antibióticos antibacterianos  
mantienen constantemente delante a los Micólogos Mé  
dicos como causas primarias e importantes de unas  
pocas formas de candidiasis y como problemas diag-  
nósticos o como agentes secundarios de enfermedad  
en muchos pacientes bajo terapia con antibióticos  
de amplio espectro.

## CLASIFICACION

De los hongos aislados de fuentes humanas, el grupo de los del tipo levadura, es el que ha presentado mayor dificultad para su estudio, debido a las grandes discrepancias de opinión en cuanto a los criterios que deben utilizarse en la clasificación. Más recientemente se han ideado mejores métodos de clasificación, y ha sido posible reducir los hongos de tipo levadura (yeastlike fungi de la literatura sajona), no productores de ascosporas, pero sí de micelios o pseudomicelios y que en tales condiciones se reproducen por clamidosporas; en un sólo género *Candida*.

El género *Candida* pertenece a los talofitos, clase de los hongos imperfectos, familia de las criptocócáceas. En la clasificación de Loder y Van Rij (1952) el género *Candida* se incluye en la misma familia y subfamilia 'criptococoideas) que el género *Cryptococcus*.

Clasificación de las especies de *Candida* que presentan interés en patología humana;

- C. albicans*
- C. stellatoidea*
- C. parapsilosis*

- C. guilliermondii
- C. tropicalis
- C. pseudotropicalis
- C. krusei

Siendo la *Candida albicans*, la especie patógena por excelencia, y exclusivamente en una forma excepcional las otras especies pueden llegar a ser patógenas.

S I N O N I M I A

Candida albicans (Robin) Berkhout, 1923

- Oidium albicans, Robin (1853)  
Monilia albicans, Zopf (1890)  
Endomyces albicans, Vuillemin (1898)  
Monilia pinoyi, Castellani y Chalmers (1913)  
Monilia psilosis, Ashford (1917)  
Parasaccharomyces ashfordi, Anderson (1917)  
Monilia metalondinensis, Castellani y Chalmers  
(1919)  
Monilia richmondi, Shaw (1926)  
Monilia aldoi, Pereire (1927)  
Mycotoruloides triades, Langeron y Talice  
(1932)  
Syringospora inexorebilis, Dodge (1935)

Candida tropicalis (Castellani) Berkhout, 1923

- Monilia candida, Hansen (1888)  
Oidium tropicale, Castellani (1910)  
Monilia tropicalis, Castellani y Chalmers  
(1913)  
Candida vulgaris, Berkhout (1923)  
Monilia zeylanoides, Castellani (1925)

- Monilia onychophila*, Pollacci y Mannizzi (1926)  
*Monilia tumefaciens*, Pollacci y Mannizzi (1927)  
*Blastodendrion intermedium*, Ciferri y Ashford  
(1929)  
*Monilia aegyptiaca*, Khouri (1933)  
*Mycotorula dimorpha*, Redaelli y Ciferri (1935)  
*Mycotorula trimorpha* Redaelli y Ciferri (1935)

*Candida krusei* (Castellani) Berkhout, 1923

- Saccharomyces krusei*, Castellani (1910)  
*Monilia krusei*, Castellani y Chalmers (1913)

*Candida parapsilosis* (Castellani y Chalmers) Camar  
go (1934)

- Monilia parakrusei*, Castellani y Chalmers  
(1913)  
*Monilia chalmersi*, Castellani y Chalmers  
(1913)  
*Myceloblastanion favrei*, Ota (1925)  
*Monilia parapsilosis*, Ashford (1928)  
*Candida brumpti*, Langeron y Guerra (1935)

*Candida pseudotropicalis* (Castellani) Basgal, 1931

- Endomyces pseudotropicalis*, Castellani (1911)  
*Monilia pseudotropicalis* Castellani y Chalmers

(1913)

*Candida mortifera*, Redaelli (1925)

*Mycocandida mortifera*, Langeron y Talice (1932)

*Monilia mortifera*, Martin, Jones, Yao y Lee

(1937)

*Candida stellatoidea* Jones y Martin, 1938

*Candida guilliermondii* Langeron y Guerra, 1938

*Endomyces guilliermondii*, Castellani (1912)

*Monilia guilliermondii*, Castellani y Chalmers

(1913)

## GENERALIDADES

### DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD:

La candidiasis vaginal es más frecuente en la diabetes y durante el embarazo. En pacientes diabéticos, la infección parece encontrarse relacionada con las grandes cantidades de azúcar existentes en sangre y orina; en el embarazo se considera como un factor predisponente el exceso de productos del tipo de glucógeno en el epitelio vaginal.

Clínicamente, la enfermedad se manifiesta con prurito vaginal, frecuentemente acompañado con ardor y dolor. A la exploración se observa eritema y edema de la mucosa vaginal, asociándose además, un flujo vaginal anormal, de color blanco con aspecto grumoso y en cantidad proporcional al grado de infección. Las lesiones parecen una dermatitis eczematoides simple, o pueden presentar pústulas vesiculosas excoriadas, y en casos algo raros ulceraciones. Las hay exudativas y pueden estar cubiertas con una pseudomembrana gris compuesta por micelios y levaduras de *Candida albicans*. Observándose este tipo de vaginitis más frecuentemente en clases económicamente pobres, más a menudo durante el embarazo (15 a 30 por ciento) que en mujeres no grávidas

(7 a 16 por ciento), y todavía con más frecuencia en mujeres negras embarazadas (41 por ciento).

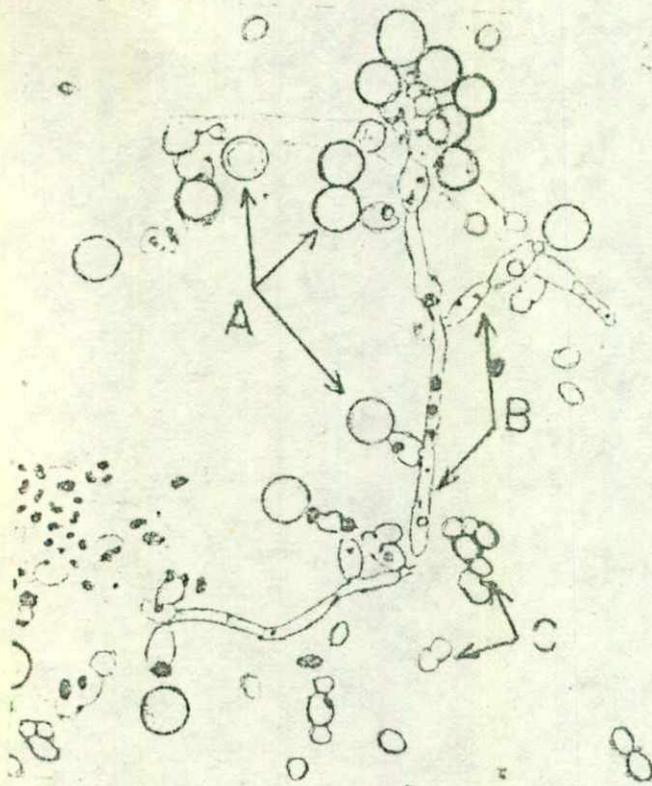
Las investigaciones de Carter y colaboradores han revelado la frecuente presencia de *Candida albicans* en casos de vulvovaginitis, pero si no existen síntomas de vaginitis suele predominar *C. stellatoidea*, organismo parecido morfológicamente pero no patógeno.

#### CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS:

Microscópicas.- En los frotis hechos a partir de productos patológicos ( esputos), aparecen las especies de *Candida* como células proliferantes de tipo levadura, grampositivas, de pared delgada, pequeñas, oves, en gemación, que miden de 2 a 3 por 4 a 6 micras de diámetro. Con frecuencia se observan simultáneamente células gemantes también de tipo grampositivo, alargadas y flexuosas ( las pseudohifas) de 2 a 5 por 3 a 14 micras de diámetro.

Macroscópicas.- En el medio agar glucosa de Sabouraud incubado a temperatura ambiente, se desarrollan colonias suaves, blanco-cremosas, lisas, de tamaño medio y de aspecto mate o húmedo; desprendiéndose de los cultivos un olor característico de

levadura. El crecimiento sumergido consiste en seudomicelios. El pseudomicelio está compuesto de seudohifas alargadas y enlazadas formando blastosporas en los nódulos y algunas veces clamidosporas en susternales.



Multiples formas estructurales en un cultivo de *C. albicans*. A, Clamidosporas . B, Seudohifas (levaduras alargadas, unidas por sus extremos). C, levaduras formando (blastosporas). X 450.

### DISTRIBUCION GEOGRAFICA:

Se ha informado de casos de candidiasis en todo el mundo, pero el hongo suele encontrarse con tal frecuencia en individuos sanos, y en tal variedad de formas clínicas que se hace imposible obtener datos correctos respecto a la distribución geográfica de la enfermedad. El crecimiento prolífico de Candida asociado con sprue tropical y asociaciones probables con dietas ricas en fruta y carbohídratos, indica algunas diferencias en la frecuen-cia de su presencia en el tracto intestinal del individuo en diferentes zonas climáticas y en varios medios sociales o económicos.

### FUENTES DE INFECCION:

Debido a que pueden ser aisladas cepas patógenas de C. albicans, en: Piel normal, mucosas bucal y vaginal normales, y en las materias fecales de individuos sanos; salta a la vista que la mayoría de las infecciones son de origen endógeno, y la determinación de la fuente infectante constituye un problema difícil. En ocasiones, la infección llega a ser contagiosa y en circunstancias especiales se presentan auténticas epidemias. Ha ocurrido ba-

lanopostitis en los maridos de enfermas que padecen vaginitis por *C. albicans*, y candidiasis cutánea en torno a los pezones de madres de lactantes con muguet o algodoncillo. La presencia de *Candida* en el individuo normal explica la diseminación durante enfermedades debilitantes, padecimientos malignos del sistema hematopoyético, diabetes sacarina, lupus eritematoso, enfermedades granulomatosas.

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

### TOMA DE MUESTRA:

Se coloca a la paciente en posición ginecológica, se introduce el espejo vaginal estéril y se toman, con tres hisopos humedecidos anteriormente con solución estéril de cloruro de sodio al 0.85 por ciento, muestras del cérvix, del fondo del saco vaginal posterior y del meato urinario. Se pueden tomar muestras convencionales abundantes para el examen directo, digamos, 2-3 décimas de mililitro; pero tomar muestras más reducidas para efectuar la siembra, sobre todo cuando se piensa que la población de levaduras es densa.

La toma de productos patológicos deberá efectuarse con precaución para evitar alguna contaminación de tales y no dar un resultado falso-verdadero, ya que *C. albicans* es muy abundante en el medio de laboratorio.

El examen micológico se practica en mujeres no sometidas a tratamientos locales activos, preferentemente durante la semana anterior a la menstruación. Cuando se trata de niñas o mujeres vírgenes no debe de usarse el espejo vaginal. Se tiene que tomar el pH de la secreción o del exudado del fon-

do de saco vaginal posterior.

#### EXAMEN DE LABORATORIO:

No suele observarse leucocitosis y la velocidad de sedimentación es normal o ligeramente aumentada en candidiasis bronquial. Se presenta regularmente cutirreacción positiva con vacuna de *C. albicans*, pero raras ocasiones se presentan aglutininas en la sangre. Suele manifestarse aumento de leucocitos neutrófilos en las formas más graves de la candidiasis pulmonar, con elevación de las cifras de eritrosedimentación. Las pruebas cutáneas efectuadas con vacuna de *C. albicans* rara vez dan una reacción tan intensa como la que se obtiene en pacientes con infección de tipo bronquial. En infecciones muy difusas, las pruebas cutáneas pueden ser negativas.

#### EXAMEN DIRECTO:

Este examen se practica con técnicas diversas, según las circunstancias: En fresco (con luz corriente o con contraste de fases), por aclaramiento con hidróxidos y tinción con tinta Parker, o me

diante extendidos teñidos con azul de metileno, por Giemsa, Gram, Schiff o Gomori.

Los raspados cutáneos o ungulares deben colocarse en un portaobjetos en una gota de hidróxido de potasio al 10 ó 20 por ciento, con aplicación de cubreobjetos y calentando suavemente la preparación en la parte baja de la llama para aclaramiento inmediato. Se somete a aplastamiento el material obtenido por raspado de las lesiones mucosas, de esputo, hasta obtener una película delgada debajo del cubreobjetos para examinación en fresco.

En cuanto a la localización vaginal, se presenta corrientemente el problema diagnóstico de la Candida, Trichomonas y Neisseria gonorrhoeae y otras bacterias patógenas. El material en estos casos se examina inmediatamente entre portaobjeto y cubreobjeto con una gota de solución fisiológica estéril, con la óptica seco fuerte. Este examen se emplea para revelar la presencia de hongos o Trichomonas. Está de más decir que el portaobjeto empleado ha sido previamente flameado, para esterilizarlo y evitar las contaminaciones extrañas del hisopo.

El material a estudio mencionado anteriormente puede teñirse por el método de Gram. Cuando se recoge muy poco material con el raspado, conviene

- extenderlo y teñirlo con azul de metileno o por Giemsa; se visualiza así mejor la flora bacteriana. En muestras tomadas directamente de la lesión aparecen las especies de Candida en forma de elementos levuriformes, ovalados o redondeados, pequeños, en gemación, de 2 a 4 micras de diámetro, con la pared fina; regularmente se descubren en la misma preparación micelios largos, especialmente en las extensiones obtenidas de las lesiones de muguet y de los exudados vaginales.

#### METODOS DE CULTIVO:

Las raspaduras o muestras tomadas con hisopo de las lesiones deben cultivarse sobre:

Agar glucosa de Sabouraud.

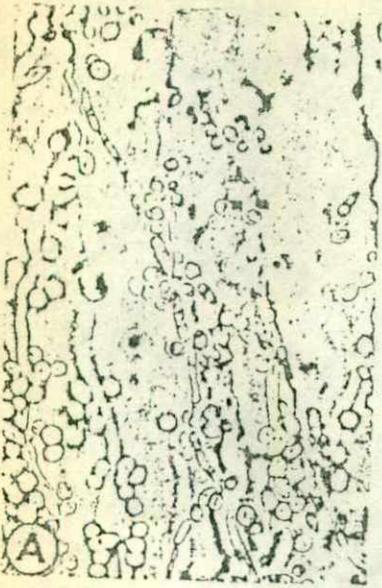
#### Composición:

Mezcla de Peptonas	10 gr.
Maltosa o Dextrosa	40 gr.
Agar	15 gr.
Agua destilada	1000 ml.

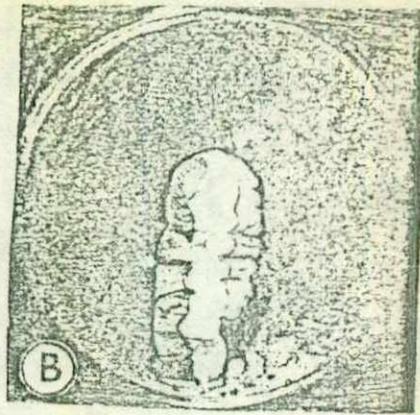
pH final  $5.6^{\pm} 0.2$

**Preparación:**- Suspender 65 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir en cajas petri y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  (15 lbs. de presión) durante 15 minutos.

El cultivo se puede verificar a  $37^{\circ}\text{C}$  o a la temperatura del laboratorio. Cuando se cultivan esputo, pus, sedimento urinario y otros materiales muy contaminados, se les trata durante 12 a 24 horas con una solución estéril al 10 por ciento de ácido cítrico para eliminar las bacterias y hongos saprófitos contaminantes; o bien, se les siembra directamente en el medio de cultivo adicionado de antibióticos. Para preparar este medio selectivo se pone a fundir el medio de Sabouraud, se le enfría a  $50^{\circ}\text{C}$  y se le adicionan 100 U. de penicilina y 100  $\mu\text{g}$  de estreptomina por mililitro de medio. Estos antibióticos pueden ser reemplazados por el cloramfenicol a razón de 100  $\mu\text{g}$ / ml. de medio de cultivo. Se manifiesta el desarrollo del organismo en dos a cuatro días en forma de colonias cremosas, de tamaño medio y de aspecto mate o húmedo.



C. albicans; Pseudohi-  
fas y acúmulos de blas-  
tosporas en agar gluco-  
sa de Sabouraud X 650.



Colonia en agar gluco-  
sa de Sabouraud mostran-  
do el fleco o borde ca-  
racterístico de la super-  
ficie de la hifa.

Investigación de Candida en materias fecales:  
Este estudio presenta, en ocasiones, particular in-  
terés práctico para revelar o prevenir una micosis  
oportunista. Se recomienda recolectar las muestras  
con las mayores precauciones de asepsia y colocar  
el volumen de unos 5 gramos, en un frasco esterili-  
zado. Debe prescribirse, en caso necesario, laxan-  
te o purgante no oleoso por dificultar, éste, el  
examen microscópico de la muestra. En el laborato-

rio, se le adiciona dos volúmenes, aproximadamente, de una solución de ácido cítrico al 10 por ciento, para eliminar la flora bacteriana, prolongando el contacto durante 24 horas al cabo de lo cual se a homogeneizar la muestra con una varilla estéril y a filtrarla con gasa doble. El filtrado se recoge en un tubo de centrífuga y se le centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, eliminando, de inmediato, lo más completamente posible, el líquido sobrenadante.

Examen microscópico.- Entre porta y cubreobjeto se hará la observación al microscópio, diluyendo el material en una gota de agua o de solución de lugol. Si ésta acusa la presencia de elementos levaduriformes (brotantes) con o sin pseudomicelio, es un índice de aumento anormal de la flora micológica.

#### Cultivos cualitativos y cuantitativos:

Las siembras en los medios de Sabouraud y de Czapek, permiten, al cabo de 8 a 10 días de incubación a 28° y a 37°C, apreciar la flora cualitativa. Para proceder al recuento de colonias, se carga, con el sedimento obtenido, una asa calibrada que equivalga a 10 mg. de peso húmedo, se deposita el material en la superficie del medio de Sabouraud -

contenido en una caja petri y se disemina con una espátula. Se procede al recuento de colonias a los 3 y 6 días de incubación a 28°C. Si el número de colonias fuera muy grande, se efectúa una nueva siembra diluyendo la muestra al 1/10 o al 1/100.

El esputo, exudados y otros productos patológicos pueden ser sometidos al análisis cuantitativo mediante una previa homogeneización.

Las diferentes especies de hongos del género *Candida* pueden ser identificadas por los siguientes procedimientos de laboratorio:

I).- El hongo es aislado en agar glucosa de Sabouraud, transplantandolo luego en:

II).- Caldo glucosado de Sabouraud (Dextrosa):

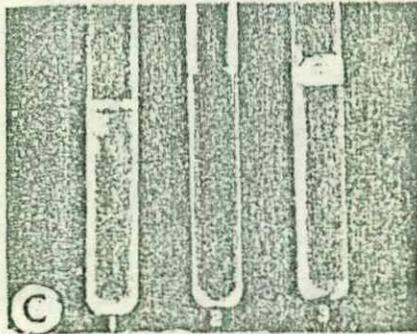
Composición:

Peptona Especial No. 2	10 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agua destilada	1000 ml.

pH final 5.7<sup>±</sup> 0.2

Preparación:- Disolver gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  (15 lbs. de presión) durante 15 ó 20 minutos. No sobrecalentar ya que por su contenido alto en carbohidratos se oscurece y pierde eficacia.

Después de haber sembrado, se procede a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se anota el tipo de crecimiento en la superficie (fig. C), posteriormente se agita el tubo con el objeto de obtener una suspensión con los organismos sedimentados.



+lis y *C. parapsilosis*. 3. Película en superficie y extensión a los lados del tubo; *C.*

*krusei*.

Cultivos en caldo de glucosa de Saboraud de dos días, a  $37^{\circ}\text{C}$ . 1. Formación de burbujas en la superficie característica de *C. tropicalis*. 2. Ausencia de crecimiento en superficie característica de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*

III).- Se extrae una muestra del tubo anterior y se siembra en estrías en una placa de Agar sangre con extracto de carne.

Agar sangre.

Base de agar sangre:

Composición:

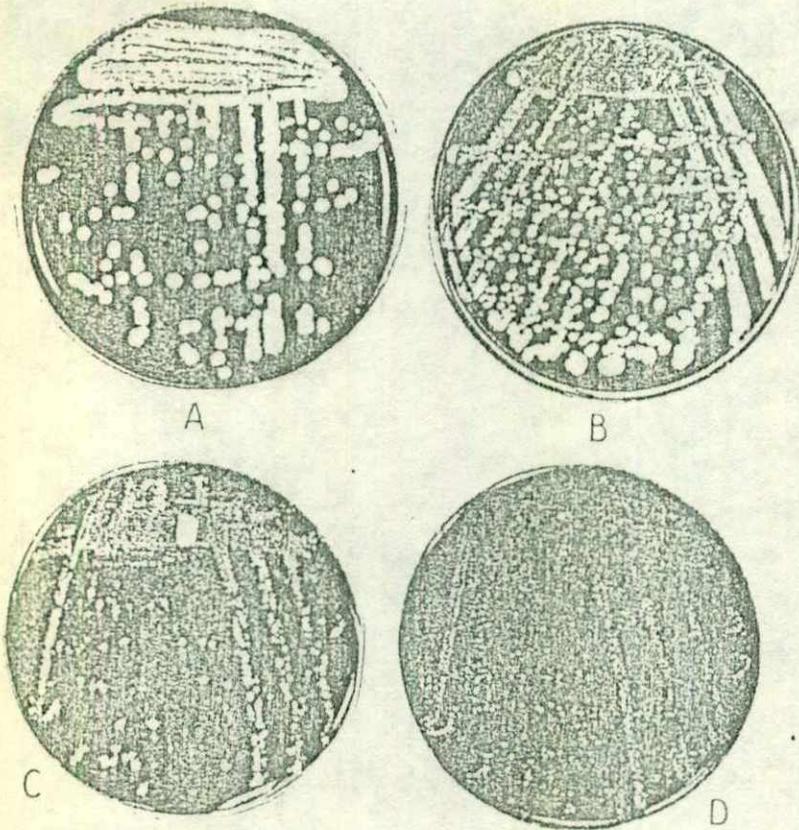
Infusión de Músculo Cardíaco	375 gr.
Peptona de Carne	10.0 gr.
Cloruro de Sodio	5.0 gr.
Agar	15.0 gr.
Agua destilada	1,000.0 ml.

p H final 7.3<sup>±</sup>0.2

Preparación:- Suspender 40 gramos del medio deshidratado en 1 lt. de agua destilada. Remojar entre 5 a 10 min.. Hervir durante 1 min. Los matraces pueden taparse y colocarse en autoclave.

Esterilizar a 121<sup>o</sup>C (15 lbs. de presión) durante 20 min. Después de esto enfriar a 45-50<sup>o</sup>C y añadir de 5 a 10 por ciento de sangre desfibrinada estéril, homogenizar y vaciar en cajas petri estériles. No se recomienda usar sangre humana. De preferencia utilice sangre de borrego o de conejo.

El medio se incubaba a 37°C durante 10 días; se registra el tipo de colonia (Según fig. siguiente):



Cultivos de especies de *Candida* sobre agar san  
gre, incubado a 37°C, durante 10 días;

- A.- *C. albicans*
- B.- *C. tropicalis*
- C.- *C. stellatoidea*
- D.- *C. krusei*

IV).- Una muestra de una colonia bien aislada es tomada para ser resembrada sobre agar glucosa de Sabouraud en tubo inclinado. Entonces se deja a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Parte del crecimiento se transplanta a un pedazo de zanahoria conservandose también a temperatura ambiente y se examina posteriormente en busca de ascas. La otra parte de nuestro material se siembra en estrías:

V).- La siembra se realiza sobre la superficie de un medio de agar con extracto de carne en tubo inclinado y con un pH de 7.4. A continuación, se procede a resembrar el crecimiento de este medio durante dos a tres generaciones.

VI).- Agar de Harina de Maíz con 1% de Tween-80.

Composición:

Agar infusión de Harina de Maíz (sin dextrosa) 17 gr  
(disponible comercialmente por BBL)

Tween-80 (disponible comercialmente por las industrias químicas atlas) 10 ml

Agua destilada 1000 ml.

Preparación:- Mezclar los ingredientes y meter

en autoclave a  $118^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Distribuir en cajas petri.

Inoculación:- Sembrar las placas de harina de maíz por el método de estrías.

1.- Emplear cajas petri con agar de harina de maíz con 1% de Tween-80.

2.- Marcar separadamente cuatro áreas en el reverso de la caja petri, empleando un lápiz graso.

Flamear el asa e inocular cuando se enfríe.

4.- Elegir una colonia de levadura aislada y separar una pequeña cantidad con la punta del asa de platino.

5.- Usar el inóculo del asa haciendo una estría de media pulgada en una parte de las cuatro áreas del agar. Haciendo cuatro estrías más paralelas a la primera. Girar la placa  $90^{\circ}$  y hacer estrías perpendiculares a la primera. Para obtener buenos resultados, siempre incida con el asa en un ángulo de  $45^{\circ}$  y aplique la presión suficiente para rayar la superficie del agar. Evite cortar profundamente el agar.

6.- Repetir del paso 3 al 5 en dos ó más áreas de la placa.

7.- Coloque una cubierta de cristal estéril (flameada con lámpara de alcohol y fría) de 22 mm sobre tres cuartas partes de cada área estriada.

8.- Inocule siempre un control conocido de *C. albicans* en la cuarta parte de cada placa.

9.- Incubar a la temperatura del laboratorio por 24 horas; examine la placa con el objetivo de poco aumento de un microscopio removiendo la tapa de la caja petri y enfocando el área cubierta por la laminilla de cristal, rodeando la orilla de la cubierta.

10.- Si se encuentran clamidosporas, reportar levaduras de *C. albicans*.

11.- Si no se presentan clamidosporas, dejar el cultivo por otras 48 horas y revise nuevamente la placa. Si no se observan clamidosporas después de 48 horas, pero se encuentran pseudohifas y blastosporas, realice estudios de asimilación y fermentación de carbohidratos. Los patrones específicos de la asimilación/fermentación sirven para identificar las especies de *Candida*.

Morfología.- Tradicionalmente, los microbiólogos han usado el agar de harina de maíz para la detección de clamidosporas producidas por *C. albicans*. Corrientemente, las aplicaciones de éste agar han sido ampliadas para incluir una presumible identificación de las especies comunes de *Candida* basadas en las características morfológicas y la diferenciación de los géneros *Cryptococcus*, *Torulopsis*, y *Saccharomyces* basadas en ciertos rasgos microscópicos.

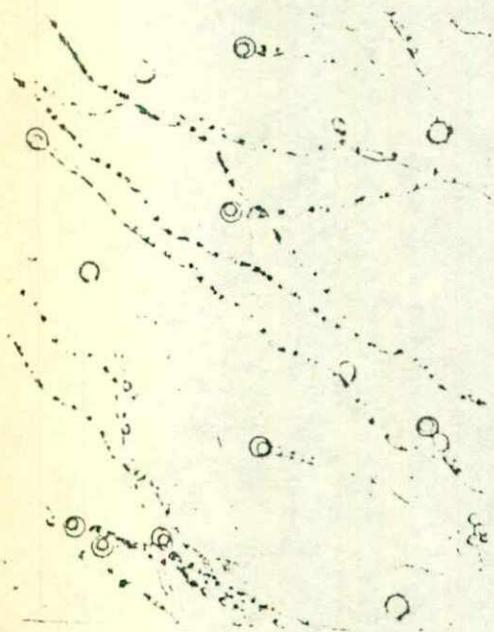
La formación de ciertos rasgos microscópicos característicos del crecimiento de las levaduras en el agar de harina de maíz son realizados por la adición de Tween-80 (polisorbato-80) el cual reduce la tensión superficial del medio y promueve la óptima formación de hifas y blastoconidias. El azul de Tripiano, otros ingredientes del medio, proveen una buena observación visual.

La formación de hifas ó pseudohifas y la producción de clamidosporas y blastoconidias en varias posiciones generales dan suficiente información para la presumible identificación de las especies comunes de *Candida*.

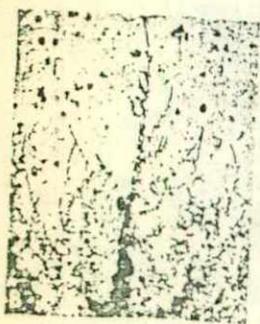
*Candida albicans* comunmente tiene dos formas microscópicas en este medio. Las clamidosporas, nacen formando espesas paredes relativamente largas o en grupos de pseudohifas, son características. La producción de grupos compactos de blastoconidias regularmente espaciadas a lo largo de las pseudohifas es una segunda formación característica de *C. albicans*.

La *C. tropicalis* también produce blastoconidias, pero estan arregladas más esparcidamente a lo largo de la pseudohifa. La *C. parapsilosis* puede ser reconocida por la formación "colonias spider" a lo largo de las estrías de inoculación, dando

dando una apariencia de cerdas de cepillo. La producción de un basto micelio o una hifa gigante pueden observarse con *C. parapsilosis*. Un arreglo de la elongación de la blastoconidia como de un "leño en una corriente de agua" es característico de *C. pseudotropicalis*.



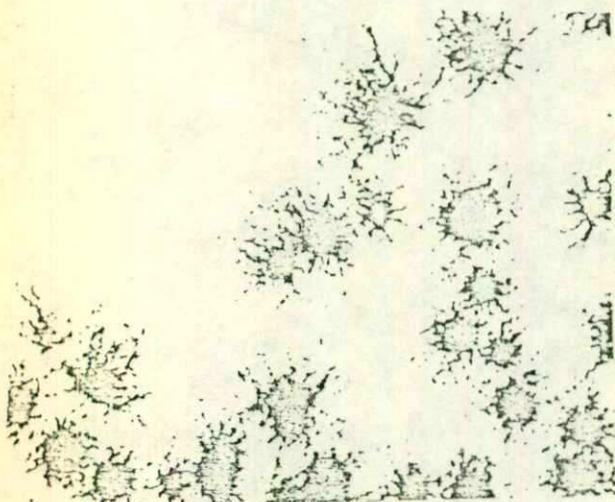
Morfología de *C. albicans* cultivada sobre agar y harina de maíz.



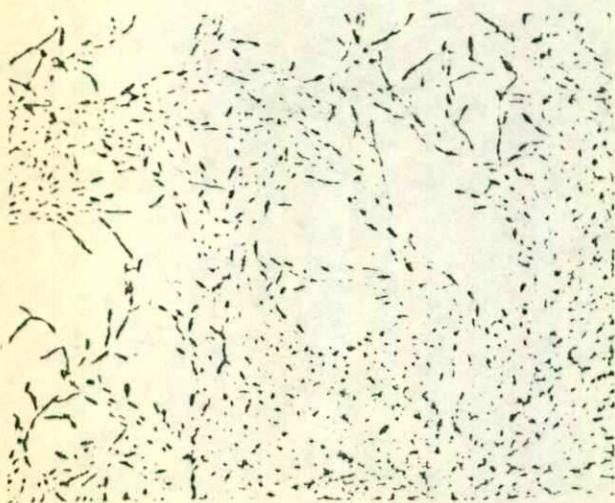
Morfología de *C. tropicalis* en cultivo de portaobjetos sobre agar y harina de maíz.



Morfología de *C. krusei* en cultivo de portaobjetos sobre agar y harina de maíz.



Fotomicrografía de *C. parapsilosis* en cultivo de agar de harina de maíz.



Fotomicrografía de *C. pseudotropicalis*, cultivo en agar de harina de maíz.

VII.- Se inoculan después, con una pipeta provista de una suspensión salina de la última resiembra del hongo sobre agar con extracto de carne en tubo inclinado, cuatro tubos de caldo de extracto de carne que contengan solución de glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa al 1 por ciento respectivamente.

VIII).- Prueba de germinación en tubo.

Características de crecimiento en sueros:

a).- Medio.

1.- Suero bovino, suero de conejo o suero humano.

2.- Coloque aproximadamente 0.3 ml de suero en un tubo pequeño. Los tubos de suero pueden congelarse hasta su uso

b).- Prueba.

1.- Emplear un cultivo reciente de levadura con crecimiento leve para inocular un tubo de suero.

2.- Incluir un tubo de suero inoculado con *Candida albicans* y otro con *C. tropicalis* en cada ronda, para controles positivo y negativo.

3.- Incubar los tubos a 35 °C por 2 a 2 1/2 horas.

4.- Colocar una gota en un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos.

5.- Examinar con objetivos de bajo y alto poder del microscópio.

6.- Características:

+ *C. albicans*: produce germinación en tu  
bo.

++ *C. stellatoidea*: Produce germinación  
en tubo.

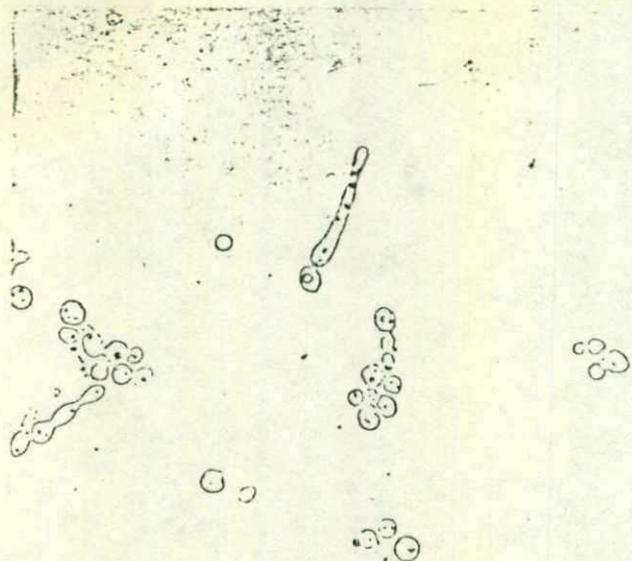
Otras *Candidas* sp.: No producen germinación en tubo.

+ La germinación de la levadura se extiende por el tubo. Esta no se detiene en su unión con la célula original mientras son pseudohifas.

++ *C. stellatoidea* es considerada una variedad de *C. albicans* por algunos pero es relativamente rara. Las dos pueden diferenciarse por su habilidad para asimilar sacarosa. La *C. stellatoidea* no asimila sacarosa.

Nota: La prueba de germinación en tubo debe realizarse en tres horas; la incubación por periodos más largos puede revelar la germinación en el tubo por otra *Candida* sp., particularmente *C. tropicalis*.

La formación de crecimiento en el tubo es definido como la producción de un apéndice de la mitad de ancho y de 3 a 4 veces la longitud de la ce  
lula de la cual surge.



Fotomicrografía de una prueba positiva de germinación en tubo, dando una identificación presuntiva de *C. albicans*. (Objetivo de gran aumento).

IX).- Agar Levine con Eosina y Azul de Metileno.  
no.

Composición:

Peptona de Gelatina	10.000 gr.
Lactosa	10.000 gr.
Fosfato Dipotásico	2.000 gr.
Agar	15.000 gr.
Eosina	0.400 gr.
Azul de Metileno	0.065 gr.
Agua destilada	1000.000 ml

pH final  $7.1 \pm 0.2$

Preparación.- Suspender 37.5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar a no más de  $121^{\circ}\text{C}$  (15 lbs. de presión) durante 15 minutos. El agar líquido estéril a  $45^{\circ}\text{C}$  se agita suavemente antes de vaciar en cajas petri.

Weld comunicó que la colonia macroscópica de *C. albicans* se puede diferenciar de la de otras especies de *Candida* cuando crece a  $37^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera de bióxido de carbono al 10 por ciento en la placa de agar de azul de metileno y eosina de Levine. Se siembra la placa en estrías con una suspensión diluida del cultivo y se examina al cabo de 18 a 24 horas con el objetivo de bajo poder. En estas circunstancias, se advierte en las colonias de *C. albicans* una orla micelial radiante. *C. stellatoidea* produce también la orla pero forma una colonia más pequeña y delicada.

#### INOCULACION ANIMAL:

Los ratones, conejos y otros animales de laboratorio son susceptibles de infección, solamente *C. albicans* es virulenta para estos animales. Los conejos inyectados por vía endovenosa con 1 ml. de una suspensión salina al 1% de cultivos, mueren en 4 a 5 días con los riñones congestionados mostrando abscesos pequeños, blancos, esparcidos en toda la zona cortical. La inyección subcutánea en conejos da origen a la formación de abscesos en 48 hrs. Otras especies de *Candida* deben ser administradas a animales de laboratorio en grandes dosis de inoculación y usualmente producen invasión no progresiva de tejidos ó sólo infecciones efímeras.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE  
LAS ESPECIES DE CANDIDA.

Especies de Candida	Agar de Sabouraud	Caldo de Sabouraud	Agar sangre
C. albicans	Colonias cremosas	Sin crecimiento en superficie	Colonias grises mates, de tamaño medio.
C. tropicalis.	No característico	Película superficial escasa y burbujas.	Colonias grandes grises rodeadas por fleco micelial.
C. pseudotropicalis.	No característico	Sin crecimiento en superficie	Colonias pequeñas no características
C. krusei.	Plana y seca.	Película superficial amplia	Colonias pequeñas, irregulares, planas o amontonadas.
C. parapsilosis.	Creмосa	Ausencia de crecimiento en superficie	Colonias pequeñas de color blanco brillante

Especies de Candida	Agar de Sabouraud	Caldo de Sabouraud	Agar sangre
C. stellatoidea.	Cremosa	Sin crecimiento en superficie	Colonias en forma de estrella.
C. guilliermondii	Cremosa	Sin crecimiento en superficie	Colonias de tamaño medio, de color gris mate

Especie Candida	Harina de maíz	glucosa.	malto sa.	Saccharosa.	Lactosa
C. albicans	Micelio ramificado en forma de árbol y clamidosporas	A.G.	A.G.	A.	-
C. tropicalis	Micelio bien desarrollado ramificado, portando numerosas blastosporas, sin clamidosporas	A.G.	A.G.	A.G.	-
C. pseudotropicalis.	Micelio mal desarrollado sin clamidosporas.	A.G.	-	A.G.	A.G.

Especie Candida	Harina de maíz	gluco sa.	Malto sa.	saca- rosa.	Lactosa
C. kru sei.	Micelio en en barras cruzadas y sin clami- dosporas.	A.G.	--	--	--
C. pa- rapai- losis.	Micelio bien desa- rrollado , sin clami- dosporas.	A.G. †	--	--	--
C. ste- llatoi- des.	Micelios con acúmu- los de blas- tosporas de gran tamaño y esferoida- les.	A.G.	A.G.	--	--
C. gui- llier - mondii.	Micelio bi- en desarro- llado, sin clamidospo- ras.	- †	--	--	--

A.G. = Acido, gas

† = Acido

† = En ocasiones ácido solamente.

†† = Langeron y Guerra informaron que hubo pro-  
ducción de ácido y gas, en glucosa y sacarosa cuen-  
do se cultiva a 25°C por 20 días.

## O C U R R E N C I A S A P R O F I T A .

La *C. albicans* es frecuente en esputo, la cavidad oral, el tracto intestinal y en la superficie de la piel que un medio endógeno de infección es probablemente usual. El hongo a sido aislado de la fruta, de las heces de animales, especialmente del puerco, y raramente de la tierra. Ha sido aislada frecuentemente del medio o aire polucionado y del agua de mar. Otras especies de *Candida* también han sido frecuentemente aisladas de la fruta, del esputo, y del tracto oral e intestinal del hombre y de algunos animales. Van Uden ha encontrado asociaciones específicas regulares de huéspedes saprófitos entre algunas especies de *Candida* en las heces de algunos animales salvajes o domesticados. Hasenclever y Kocan (1975) encontraron *C. albicans* en el tracto gastrointestinal de un gran número de palomas. Grupos antígenos A y B aparecen con casi la misma frecuencia relativa que en los medios humanos. La frecuente presencia de especies de *Candida* en las superficies dérmicas y mucosas del hombre deben ser consideradas en todos los estudios etiológicos de candidiasis.

## P A T O L O G I A .

Con excepción del material obtenido de operaciones pulmonares, las lesiones debidas a *Candida* son raramente encontradas en pacientes quirúrgicos.

En material de autopsia *Candida* puede ser vista en úlceraciones superficiales de la membrana mucosa del tracto alimentario o bronquial desarrolladas durante los últimos estadios de la enfermedad. No obstante, la candidiasis puede ser una complicación severa y fatal en un paciente cuya resistencia haya sido reducida a causa de una enfermedad crónica o de su tratamiento. En ciertos casos las lesiones causadas por *Candida* se esparcen, apareciendo como microabscesos en pulmón, corazón, riñón, cerebro y otros órganos. En la endocarditis debida a *Candida*, las vegetaciones exuberantes contienen gran número de micelios y blastosporas. El engrosamiento fibrótico crónico de la válvula subyacente puede indicar que el hongo ha sido superpuesto en algún otro tipo de lesión valvular. La reacción histológica en la candidiasis aguda o terminal es focal, con supuración aguda, con la formación de pequeños abscesos en el que los neutrófilos abundan. Histológicamente no hay nada distintivo acerca de esas lesiones porque muchas bacterias pueden provocar microabscesos similares.

## - T R A T A M I E N T O .

Algunas formas de candidiasis mejoran sin terapia, por ejemplo, la candidiasis vaginal después del parto. En las infecciones superficiales el control de los factores fundamentales de la enfermedad es importante, y a veces suficiente como tratamiento: Así tenemos, el tratamiento de la diabetes mellitus por administración de dietas escasas en carbohidratos y medicamentos; y la supresión del tratamiento antibacteriano tan pronto como sea posible.

Desde el punto de vista terapéutico, para la vulvovaginitis por *Candida*, se aconsejarán, el empleo de pincelaciones con colorantes (vioformo, quinocol, auramina, violeta de genciana, verde brillante 1 a 2% acuoso), glicerina boricada, tintura de yodo al 2%. El borato de sodio localmente. las pomadas con ácido undecilénico, ácido salicílico, los ésteres del ácido paraoxibenzoico (nipegin, nipasol o paraben), la resorcina y crisarobina, son los principios activos eficaces para combatir las infecciones superficiales por *Candida*.

La griseofulvina es inactiva en los hongos levaduras. No será necesario un tratamiento sistémico con anfotericina B. Se puede emplear la pima-

ricina, en forma de tabletas vaginales de Pimafu -  
cin o de pomada Pimafucort, así como pomada de Am-  
pho-Moronol.

Como tratamiento de la vaginitis se obtienen  
buenos resultados con la aplicación local de nista-  
tina (100.000-200.000 U./día) ó Moronal, ya que es  
un antibiótico casi específico para *C. albicans* ,  
del grupo químico de los polienos, producidos por  
el *Streptomyces noursei*, su presentación es en for-  
ma de polvo. suspensión y como ovulos o tabletas  
vaginales; además, se emplea la anfotericina B (10  
a 50 mg/día) o tricomicina (Trichonol, Cabimicina),  
a la dosis de 10 a 50 mg/día durante dos semanas.  
Con cualquiera de estos medicamentos los resulta-  
dos son superiores a los obtenidos con violeta de  
genciana y la proporción de recaídas es menor (en-  
tre 20 a 40% de los casos tratados). En los casos  
rebeldes cabe administrar nistatina por vía oral a  
la dosis de 500.000 U./día. También se han señala-  
do buenos resultados con la administración de clo-  
rodantofina (Sporostacin, Ortho); dos aplicaciones  
diarias durante 14 días proporcionan, según Nathan-  
son (1960), más de 70% de resultados satisfactori-  
os.

Carter, Jones y colaboradores han ensayado la  
nistatina y anfotericina B en la terapia de vagini-  
tis por *Candida*. Sus resultados no fueron tan sa -

tisfactorios como los que se obtuvieron con gel de propión. Esta substancia fue empleada por Alter y colaboradores en 1947; se trata de una jalea simple con una base de bentonita que contiene calcio y propionato de sodio. El tratamiento proporciona un alivio inmediato y curación en un 80 por ciento de mujeres no grávidas. Ocurren recaídas después de este tipo de tratamiento y también después de administración de nistatina y anfotericina B. Los pacientes con recaídas que presentan una sensibilidad manifiesta a una vacuna autógena o de depósito preparada con *C. albicans* podrían mejorar después de hiposensibilización.

Después de haber establecido el tratamiento específico, es importante considerar la frecuencia con que se encuentra la recidiva del padecimiento y es en este momento en donde cabe recordar que los reservorios de esta levadura existen en el hombre y la mujer, siendo en ésta tal vez el más importante, el que se refiere al tracto gastrointestinal ya que por contigüidad es fácil el paso del hongo a la cavidad vaginal.

En el hombre, el lugar, el lugar en que se localiza *C. albicans* con más frecuencia es en el tracto genitourinario de donde pasan, durante las relaciones sexuales, a la cavidad vaginal.

Por lo anterior consideremos que al trazar un programa terapéutico en la candidiasis vaginal es necesario suprimir los factores predisponentes y a bordar los reservorios en la mujer (tracto gastrointestinal) y en el hombre (tracto genitourinario) mediante drogas por vía oral en la mujer y acidificantes de la orina en el hombre.

## CONCLUSIONES

La candidiasis vaginal es causada por la especie *Candida albicans*.

Esta infección es de tipo endógeno puesto que son huéspedes habituales de la piel, tracto digestivo y respiratorio, y desde estos lugares pueden ser llevadas las levaduras hasta la cavidad vaginal por la misma persona.

El padecimiento se presenta con más frecuencia en mujeres embarazadas, en las diabéticas y en todas aquellas personas que presentan un padecimiento crónico en los que las resistencias del organismo están disminuidas o existen factores que predisponen la infección.

Para que la enfermedad se establezca es necesario que disminuya el espesor del epitelio vaginal, su contenido de glucógeno, se altere el pH y que este ausente el bacilo de Douderslain.

La enfermedad se manifiesta clínicamente después de la administración de antibióticos en grandes cantidades como terapia de otros padecimientos.

Puede ocasionar una ruptura de las barreras naturales de defensa por las alteraciones que produce en los tejidos vaginales y del cuello del útero que disminuyen la elasticidad de las estructuras.

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

- 1) INTRODUCCION A LA MICOLOGIA  
CONSTANTINE JOHN ALEXOPOULOS  
EDITORIAL UNIVERSITARIA DE BUENOS AIRES  
1966  
PAGINAS: 415-417.
  
- 2) MICOSIS CUTANEAS Y VISCERALES  
PABLO NEGRONI  
CUARTA EDICION 1969  
LOPEZ LIBREROS EDITORES  
PAGINAS: 68-74.
  
- 3) MICOLOGIA  
DR. NORMAN F. CONANT  
DR. DAVID TILLERSON SMITH  
DR. ROGER DENIO BAKER  
DR. JASPER LAMAR CALLAWAY  
TERCERA EDICION 1972  
EDITORIAL INTERAMERICANA

- 31-
- 4) PRACTICAL LABORATORY MYCOLOGY  
KONEMAN  
THE WILLIAMS AND WILKINS COMPANY  
BALTIMORE  
SEGUNDA EDICION 1979  
PAGINAS: 103,105-112
  - 5) PRACTICAL CLINICAL MICROBIOLOGY AND  
MICOLOGY: TECHNIQUES AND INTERPRETATION  
WOLF ROSSELL SHIMODA  
PAGINAS: 441-443, 366-369
  - 6) MICOLOGY MEDICAL  
EMMONS/BRINFORD/UTZ/KWON/CHUNG  
THIRD EDITION  
EDITORIAL LEA Y FEBIGER PHILADELPHIA  
PAGINAS: 185-200.
  - 7) TRATADO DE MICROBIOLOGIA  
DR. WILLIAM BURROWS  
VIGESIMA EDICION 1974  
EDITORIAL INTERAMERICANA  
PAGINAS: 598-599, 606,614, 623-627,697.
  - 8) COLOR, ATLAS Y TEXBOOK OF DIAGNOSTICAL  
MICROBIOLOGY  
KONEMAN/ALLEN/DOWEL Y SOMMERS  
J.B. LIPPINCOTT COMPANY PHILADELPHIA  
PAGINAS: 55-82.

- 9) MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA  
DR. ERNEST JAWETZ  
DR. JOSEPH L. MELNICK  
DR. EDWARD A. ADELBERG  
OCTAVA EDICION  
EDITORIAL EL MANUAL MODERNO, S.A.  
PAGINAS: 319-321.
- 10) TRATADO DE MICROBIOLOGIA  
BERNARD D. DAVIS, M.D.  
RENATO DULBECCO, M.D.  
HERMAN N. EISEN, M.D.  
HAROLD S. GINSBERG, M.D.  
W. BARRY WOOD, JR., M.D.  
MACLYN Mc CARTY, M.D.  
SEGUNDA EDICION 1980  
EDITORIAL SALVAT  
PAGINAS: 1003, 1017-1019.
- 11) DERMATOLOGIA IBERO LATINO AMERICANA  
ORGÃO OFICIAL DO COLEGIO IBERO-LATINO  
DE DERMATOLOGIA  
AÑO XIII No. 4 1971
- 12) GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DE MEXICO  
VOL. 46 No. 275  
SEPTIEMBRE 1979

- 13) A. PEDRO PONS  
FATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS  
TOMO VI  
EDITORIAL SALVAT  
TERCERA REIMPRESION 1975.
- 14) GINECOLOGIA Y OBTETRICIA  
TOMO III GINECOLOGIA ESPECIAL  
O. KASER  
J. FRIEDBERG  
K.G. OBER  
K. THOMSEN  
J. ZANDER  
REIMPRESION 1975  
EDITORIAL SALVAT.