

FLORA LEVADURIFORME DE LA VAGINA HUMANA DURANTE EL EMBARAZO*

Por Samuel Manero Martínez.

INDICE

- 1.—INTRODUCCION.
- 2.—REVISION BIBLIOGRAFICA.
- 2.1. RESUMEN HISTORICO.
 - 2.1.1. *Descubrimiento de las levaduras*—2.1.2. *Evolución cronológica de los géneros a los que pertenecen las especies aisladas*.—2.1.2.1. *Género Saccharomyces*.—2.1.2.2. *Género Candida*.—2.1.2.3. *Género Torulopsis*.—2.1.3. *Levaduras en vagina*.—2.2. TAXONOMIA.—2.3. MATERIAL Y METODOS.—2.3.1. *Toma de muestras*.—2.3.2. *Aislamiento y mantenimiento*.—2.3.3. *Tipificación*.—2.3.3.1. *Características morfológicas*.—2.3.3.2. *Características sexuales*.—2.3.3.3. *Características fisiológicas*.—2.3.3.4. *Pruebas complementarias*.—3. MATERIALES Y METODOS.—3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS.—3.1.1. *Posición de la gestante (posición litotómica)*.—3.1.2. *Técnica de la toma*.—3.2. CULTIVO, RECUENTO Y AISLAMIENTO.—3.2.1. *Siembra*.—3.2.2. *Recuento y aislamiento*.—3.3. TIPIFICACION.—1. *Características morfológicas*.—a) *Características de reproducción vegetativa*.—b) *Características de las células vegetativas*.—2. *Características del cultivo*.—a) *Crecimiento en medio líquido*.—b) *Crecimiento en medio sólido*.—3. *Características sexuales*.—a) *Formación de ascosporas*.—4. *Características fisiológicas*.—a) *Utilización de compuestos de carbono*.—I. *Utilización fermentativa*.—II. *Utilización oxidativa*.—b) *Utilización de NO_3K* .—5. *Producción de tubos germinales*.—4. RESULTADOS Y DISCUSION.—4.1. CLASIFICACION CLINICA DE LAS MUJERES GESTANTES.—4.2. AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y SU RELACION CON LOS DIFERENTES PARAMETROS CLINICOS.—4.2.1. *Frecuencia total*.—4.2.2. *Frecuencia en relación con la paridad*.—4.2.3. *Frecuencia en relación con la presencia o ausencia de síntomas clínicos*.—4.2.3.1. *Frecuencia en relación con las distintas manifestaciones clínicas*.—4.2.4. *Frecuencia en relación con los distintos períodos de la gestación*.—4.2.5. *Frecuencia en relación con el estado civil*.—4.2.6. *Frecuencia en relación con la edad*.—4.2.7. *Frecuencia en relación con los meses del año*.—4.3. RECUENTO DE COLONIAS.—4.4. FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS GENEROS Y ESPECIES Y SU RELACION CON LOS DIFERENTES PARAMETROS CLINICOS.—4.4.1. *Frecuencia en relación con la paridad*.—4.4.2. *Frecuencia en relación con la presencia o ausencia de síntomas clínicos*.—4.4.2.1. *Frecuencia en relación con las distintas manifestaciones clínicas*.—4.4.3. *Frecuencia en relación con los distintos períodos de la gestación*.—4.4.4. *Frecuencia en relación con la edad*.—4.5. FRECUENCIA EN RELACION CON OTROS PARAMETROS.—4.5.1. *Variación estacional*.

* Este trabajo constituye la Tesis Doctoral del autor, leída el 5 de diciembre de 1972 en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, obteniendo la calificación de «Sobresaliente Cum Laude».

4.6. ESTUDIO ESPECIFICO DE *C. albicans*.—4.6.1. Recuento de colonias de *C. albicans*.—4.6.2. Técnicas especiales de identificación.—4.6.2.1. Formación de tubos germinales.—4.6.2.2. Producción de clamidosporas.—5. CONCLUSIONES.—6. RESUMEN.—7. AGRADECIMIENTOS.—8. BIBLIOGRAFIA.—9. ILUSTRACIONES.

1. INTRODUCCION

El estudio de la flora levaduriforme del aparato genital femenino externo, ha adquirido un gran interés durante los últimos años, por considerarla responsable de algunos procesos inflamatorios de la vagina.

Su importancia es cada vez mayor, de tal manera que, hoy en día, nos encontramos en la clínica ginecológica, con un número creciente de micosis vaginales, las cuales son un constante problema para el especialista, que en muchas ocasiones necesita un correcto diagnóstico con vistas a la terapéutica. Ello nos lleva a la conclusión, de que su estudio es de gran valor en nuestras latitudes, tanto desde el punto de vista práctico como del puramente científico.

La mayoría de los investigadores ha venido señalando la influencia de diversos factores, sobre la presencia de levaduras en la vagina, considerándose a la gravidez, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, antibioterapia, corticoterapia, influencias ambientales, anticonceptivos hormonales o mecánicos, etc., entre los de más relieve.

La presente investigación tiene por objeto el estudio del primer factor relacionado. Para ello, nos hemos propuesto comprobar las distintas especies de levaduras existentes en la vagina y su variación estacional, así como su frecuencia en términos absolutos y en relación con los distintos parámetros ocurrentes en la gravidez, tales como paridad, presencia o ausencia de manifestaciones clínicas, período de la gestación, estado civil y edad de la mujer.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. RESUMEN HISTORICO.

2.1.1. Descubrimiento de las levaduras.

CAGNIAR-LATOUR, en Francia, y SCHWANN, en Alemania, casi al mismo tiempo, en 1836 y en 1837, respectivamente, fueron quienes descubrieron que las fermentaciones del vino y de la cerveza se relacionaban con el crecimiento de un hongo determinado. SCHWANN vio, en 1837, que se multiplicaba por gemación, y MEYEN en 1838, confirmó las observaciones de SCHWANN, denominando al organismo capaz de fermentar la cerveza *Saccharomyces cerevisiae*.³⁸

El término levaduras se impuso rápidamente para denominar a los microorganismos productores de las fermentaciones alcohólicas y proviene de la elevación que ocasiona en la masa en fermentación («se lever» levantarse en francés, «yeast» espuma en inglés) ^{38,52}.

2.1.2. Evolución cronológica de los géneros a los que pertenecen las especies aisladas.

2.1.2.1. Género *Saccharomyces*.

MEYEN, en 1838, denominó *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. vini* y *Sacch. pomorum* a los microorganismos responsables de la fermentación de la cerveza, el vino y la sidra, respectivamente. REESS, en 1870, limitó el género a las levaduras asporógenas no formadoras de verdadero micelio, incluyéndolas en los Ascomycetos.³⁸

2.1.2.2. Género *Candida*.

Según diversos investigadores, LANGENBECK (1839) fue el primero que observó este género, al aislar levaduras de aftas (WINNER y HURLEY⁵⁸), de materias fecales (SIMONE⁵²) o de boca (AGÜERO y FEO¹). GRUBY, en 1842 (cit. por WINNER y HURLEY⁵⁸), estudió la levadura de LANGENBECK y la consideró como causante del «muguet», incluyéndola en el género *Sporotrichum*.

ROBIN, en 1847, la incluyó dentro del género *Oidium*.⁵⁸ ROBIN, en 1853, en un libro que escribió sobre micología y que permaneció como clásico durante largo tiempo, le da ya el nombre específico de *Oidium albicans*.^{38,58}

QUINQUAUD, en 1868, criticó el hecho de que ROBIN la hubiera incluido en el género *Oidium*, denominándola *Syringospora robinii*.³⁸ ZOPF, en 1890, la denominó *Monilia albicans*, nombre ampliamente difundido a lo largo de la primera mitad del siglo XX.^{38,58}

Siguiendo a BENHAN (cit. por WINNER⁵⁸), fue JOHN HILL, en 1751, el primero que utilizó el nombre *Monilia* para un hongo aislado de vegetales, y los botánicos lo usan hoy día para designar hongos que difieren de las levaduras. PERSOON, en 1797, y cuatro años más tarde, en 1801, lo aplicó a un género en el cual incluía doce hongos, utilizando el nombre específico *candida* en unión del genérico *Monilia*, para un hongo que no guardaba relación con los pertenecientes a los géneros *Candida* o *Monilia*, sino con algún tipo de *Aspergillus*. Asimismo, señaló que fueron PLAUT, en 1887, y ZOPF, en 1890, los que condujeron al error de denominar *Monilia* a la levadura productora del «muguet». El primero aisló un hongo de la madera, que inoculó a pollos, en los que produjo lesiones similares a las de esta enfermedad y lo denominó *Monilia candida*, considerando que era el mismo agente que producía lesiones en el hombre y al que ZOPF denominó, finalmente, *Monilia albicans*, en 1890.⁵⁸

CASTELLANI (1914) realizó estudios bioquímicos sobre la levadura productora del «muguet» comparando los géneros *Syringospora* (Quinquaud) y *Monilia* (Zopf) y llegando a la conclusión de que pertenece a este último.

BERKHOUT (1923) propuso el nombre *Candida* para el género.^{38,58} En 1939, en una reunión no oficial del III Congreso Internacional de Microbiología celebrado en New York, se recomendó el uso del nombre *Candida*.³⁸ Finalmente, en el año 1954, en el VIII Congreso Internacional de Botánica de París, se aceptó como definitivo y como *nomen conservandum*, el de *Candida* para el género.⁵⁸

2.1.2.3. Género *Torulopsis*.

En 1838, TURPIN usó el nombre *Torula* para designar a un género de levaduras, pero esto era inadmisible, ya que PERSOON utilizó dicho nombre, en 1796, para un grupo de mohos coloreados. BERLESE, en 1895, sustituyó el nombre *Torula* dado por TURPIN por el de *Torulopsis*. El trabajo de BERLESE fue desconocido por muchos investigadores, debido a estar publicado en una revista de difícil acceso, siendo SACCARDO (1906), quien dio como válido el nombre de *Torulopsis* de BERLESE.³⁸

CIFERRI, en 1925, y CIFERRI y REDAELLI, en 1929, incluyeron en este género levaduras asporógenas coloreadas e incoloras, no formadoras de micelio y con o sin propiedades fermentativas.³⁸ En 1934, LODDER (cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³⁸) excluye del mismo a las levaduras productoras de pigmentos carotenoides.

2.1.3. Levaduras en vagina.

Según GRASSET y col.,²⁹ la primera noción de micosis vaginal fue dada por BLAYEU, en 1828. AGÜERO y FEO¹ y CARTER y col.,¹³ citan a M. WILKINSON, en 1840, como el primero en demostrar la presencia de un organismo levaduriforme en leucorrea vaginal. Según WINNER y HURLEY,⁵⁸ fue J. S. WILKINSON quien, en 1849, publicó un artículo que es considerado como la primera descripción de una candidosis vaginal, en el cual relacionaba la existencia de un hongo con una leucorrea.

Siguiendo a WINNER y HURLEY,⁵⁸ MAYER, en 1862, refiere seis casos y WINCKEL, en 1866 realizó por primera vez una infección experimental en conejo, a partir de levaduras aisladas de astas vaginales de una mujer.

En 1875, HAUSSMANN reprodujo la enfermedad, inoculando material procedente de la vagina de una mujer portadora de levaduras, a otra mujer embarazada normal; es ésta la primera infección experimental realizada en la especie humana.^{35 58}

En 1934, HESSELTINE, BORTS y PLASS (cit. por JONES y col.³⁵) inocularon 18 pacientes con cultivos puros de dos especies de *Candida*, provocando la infección en doce de ellos.

A partir de entonces, sobre todo en los últimos lustros, el tema de las levaduras en la vagina humana ha sido objeto de la atención de numerosos autores, que han glosado sus descubrimientos en gran número de trabajos científicos, ocupando siempre un lugar destacado en los simposios que se han celebrado sobre levaduras.

2.2. TAXONOMIA.

Es difícil hacer una clasificación de las levaduras, ya que este término incluye un número de microorganismos en los cuales el carácter unicelular es lo más sobresaliente.

LODDER y KREGER VAN RIJ³⁸ distinguen tres grupos principales de hongos. El primero comprende aquellas levaduras que, al lado de una reproducción vegetativa, tienen otra sexual, con formación de ascosporas. Estas levaduras ascospórogenas pertenecen a la clase Ascomycetos, familia Endomycetaceae. El segundo grupo se caracteriza por una reproducción vegetativa, por gemación principalmente, y por la formación de balistosporas, clasificándose en la familia Sporobolomycetaceae de posición sistemática incierta, ya que existe la duda de si las balistosporas deben ser consideradas como basidiosporas, o como conidios. En el tercer grupo no se forman ascosporas ni balistosporas; estas levaduras pertenecen a los Hongos Imperfectos, familia Cryptococcaceae.

LODDER³⁷ propone esta clasificación, que es la más actual. Estudia los siguientes órdenes:

1. En el orden Endomycetales incluye las levaduras ascospórogenas.
2. Un grupo formado por los géneros *Leucosporidium* y *Rhodosporidium*, en el orden Ustilaginales, pertenecientes a la clase Basidiomycetes, subclase Heterobasidiomycetidae.
3. Un grupo formado por la familia Sporobolomycetaceae, dentro de la clase Basidiomycetes.
4. Un último grupo formado por las levaduras que no se reproducen sexualmente, ni forman balistosporas, incluidas en los Hongos Imperfectos o Deuteromycetes, familia Cryptococcaceae.

2.3. MATERIAL Y METODOS.

2.3.1. Toma de muestras.

Previa colocación en vagina de un espéculo estéril, sin lubrificar, la toma de muestras se realiza principalmente de las paredes y fondos de saco vaginales, con ayuda de hisopos de algodón secos, estériles y conservados en tubos conteniendo caldo Sabouraud^{16,31} o agua estéril.²⁸

Algunos autores hacen las tomas no sólo de la vagina, sino también de la vulva (labios menores e introito)^{1,13,16,52,54} e incluso de la superficie del cuello uterino.^{9,16} Otros obtienen las muestras de las lesiones de la mucosa vaginal o superficie cervical sospechosas de micosis o, en ausencia de ellas, del fondo del saco vaginal posterior.²⁵

CANESE¹² realiza la toma de muestras de las secreciones, sin la colocación previa de un espéculo en el interior de la vagina.

2.3.2. Aislamiento y mantenimiento.

La mayoría de los autores consideran como medio más idóneo para el aislamiento al agar Sabouraud, bien solo^{9,13,22,29,32} o bien adiconado de antibióticos tales como estreptomicina⁵ y cloranfenicol o acromicina.¹

Otros medios citados en la bibliografía, pero no usados con tanta frecuencia para el aislamiento, son: medio de Nickerson,^{6,14,15,52} caldo glucosado,⁴⁷ agar miel de Sabouraud^{6,52} agar extracto de malta⁴⁰ y medio Pagano-Levin.^{27,52}

Las cepas aisladas pueden mantenerse en agar malta, cubriendo el crecimiento con parafina líquida, o bien se conservan en suspensiones concentradas en agua destilada estéril.³⁸

2.3.3. Tipificación.

2.3.3.1. Características morfológicas.

a. Forma y tamaño de las células y colonias.

LODDER y KREGER VAN RIJ³⁸ recomiendan el uso de extracto de malta y agar malta respectivamente.

b. Pseudomicelio.

Para la formación de pseudomicelio los medios más utilizados son «corn meal agar» y agar patata.^{16,38,56}

c. Clamidosporas.

Siguiendo a AINSWORTH,² podemos definirlas como esporas de pared gruesa, no persistentes, asexuales, intercalares o terminales, formadas por redondeamiento de una o varias células; su nombre deriva del vocablo griego «chlamys» = capa.

Los medios más utilizados para su producción son los siguientes:

1. Agar arroz o medio de Taschdjian, más Tween 80 al 1%.^{1,28,47,54}
2. «Corn meal agar», más Tween 80 al 1%.^{3,7,25,27}
3. Medio de Nickerson.^{3,19,24}

DAWSON,¹⁷ para comprobar la eficacia de los distintos medios utilizados en la producción de clamidosporas, comparó los siguientes:

Agar Czapek-Dox, «Corn meal agar» y el medio de Taschdjian, con Tween 80 al 1% y sembrando bien en el fondo de la placa o bien en «bocadillo» entre dos películas de agar. La adición de Tween 80 se efectúa con el fin de conseguir una disminución de la tensión superficial.⁵²

BAKERSPIGEL⁷ considera como medio muy eficaz el de SKINNER y FLECTCHER a base de taurocolato sódico.

SIMONE,⁵² utilizando entre otros el medio de NEGRONI-DAGLIO, lo recomienda como el más efectivo.

PEÑA YÁÑEZ y APARICIO GARRIDO⁴⁶ dan mayor valor al medio de DROUHET¹⁸ a base de agar-patata-zanahoria-bilis.

2.3.3.2. Características sexuales.

La formación de ascosporas por las levaduras es útil para la diferenciación en familias. Para su estudio, es preciso utilizar un medio pobre y realizar su observación mediante extensiones teñidas, que permitan diferenciar claramente las ascosporas de las células de las levaduras.

LODDER y KREGER VAN RIJ³⁸ recomiendan medios a base de vegetales como zanahorias, patata, remolacha, pepino y nabos, o bien medios especiales como el agar Gorodkowa, agar acetato de Fowell, agar acetato de Klein, agar acetato de McClary, etc. Es recomendable el uso de un medio de pre-esporulación, que puede ser agar YM de Wickerham, o bien agar malta. Para la tinción de las esporas, previa extensión en porta, utilizan el método de WIRTZ modificado por SCHAEFER-FULTON o el de KUFFERATH modificado. El primero de ellos se basa en una tinción de las ascosporas por el verde malaquita y una coloración de contraste con safranina. En el segundo, las ascosporas se tiñen por la fucsina y el resto de las células con azul de metileno.

CARTER y col.,¹³ así como JONES y col.³³ y DAWKINS y col.,¹⁶ utilizan para el estudio de las ascosporas medio a base de zanahoria.

SIMONE,⁵² considera de gran utilidad el agar Gorodkowa.

PEREIRO MIGUENS⁴⁷ y GONZÁLEZ-OCHOA y GARCÍA RAMOS²⁸ prefieren agar Gorodkowa y medio a base de zanahoria o bloques de yeso.

FANIEREE y col.²⁰ emplean como medio de esporulación el V_S a base de jugo de vegetales).

2.3.3.3. Características fisiológicas.

Las características fisiológicas de las levaduras constituyen el paso más importante para la diferenciación en géneros y especies; las pruebas comúnmente realizadas son: fermentación de azúcares o zymograma, asimilación de compuestos carbonados (azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos), asimilación de compuestos nitrogenados (nitrato y nitrato potásico, sobre todo este último), desdoblamiento de la arbutina, necesidades vitamínicas de crecimiento, etc.

La fermentación de azúcares puede realizarse en un medio líquido a base de extracto de levaduras, al que se incorpora el azúcar correspondiente al 2 %, excepto en el caso de la rafinosa, que debe ir al 4 % (WICKERHAM cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³⁸), o adiconando al sistema anterior peptona³⁸ y azul de bromotimol como indicador.⁸ Algunos autores utilizan como medio el agua de peptona Andrade.^{1,9,18}

Generalmente se emplean para observar la formación de gas los tubitos de Durham, aunque BÜRGER¹¹ recientemente ha adoptado la modalidad de disponer la suspensión de levaduras y el azúcar en una cámara de tres celdas, adaptando un cubre-objetos sobre parte de la misma, de manera que al formarse el gas se puede poner de manifiesto bajo la pared del cubre.

La asimilación de compuestos carbonados se realiza en medio líquido o sólido, siendo más fiel en el primero, pero más rápido en el segundo. Precisamente, en la utilización de un medio sólido se basa el método auxonográfico, consistente en la distribución en la misma placa, donde previamente se ha mezclado el inóculo y el agar, de los diferentes azúcares convenientemente separados y marcados. Tiene la ventaja de ofrecer una visión de conjunto y así poder apreciar rápidamente, por comparación del crecimiento, los compuestos carbonados que son asimilados.

Diversos autores^{1,9,18,29,59} utilizan estas técnicas de asimilación para la tipificación de levaduras.

La asimilación de NO₃K, se realiza de la misma manera que la de los compuestos carbonados, esto es: en medio líquido y sólido, si bien en este último se considera muy conveniente colocar peptona en una parte de la placa para que sirva como testigo de crecimiento.

2.3.3.4. Pruebas complementarias.

Son aquellas utilizadas con el fin de efectuar el diagnóstico rápido de una cepa determinada.

En el presente trabajo, se realizó la filamentación rápida o producción de tubos germinales por parte de *Candida albicans*, conocido también con el nombre de Efecto R. B. de acuerdo con las iniciales del nombre de los autores: REYNOLDS y BRAUDE que lo describieron por vez primera en 1956.⁴ De acuerdo con AINSWORTH,² consideramos los tubos germinales como hifas germinativas, que emergen a través de un poro (poro germinal) formado en la pared de una célula.

La producción de tubos germinales tiene lugar en albúmina y líquidos orgánicos tales como suero, plasma, sangre total, líquido cefalorraquídeo.⁴ El medio más frecuentemente utilizado es el suero sanguíneo, bien de procedencia animal (bovino, canino, equino, de conejo, de cobayo) o bien humano, en cantidad de 0,5 ml. en tubos de hemólisis o similares.

MACKENZIE³⁹ y ALTERAS y GAVILES⁴ utilizan los sueros descritos anteriormente y como inóculo, el primer autor usa una suspensión de 8×10^6 células y el segundo el vértice de una colonia.

BONFANTE y col.⁹ y BOROWSKI y col.¹⁰, sirviendo como inóculo la parte superior de una colonia y una suspensión de células respectivamente, emplean suero de procedencia humana.

GATTI y ACCIGLIARO,²⁵ al mismo tiempo que suero, utilizan también líquido ascítico y albúmina.

PORTER y PYLE⁴⁸ emplean solamente albúmina para la determinación de tubos germinales.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS.

El número de muestras recogidas ascendió a la cantidad de 1.450, durante el período de tiempo comprendido entre el 1 de agosto de 1970 y el 31 de julio de 1971.

El material analizado fue secreción vaginal (flujo) procedente de mujeres gestantes de una consulta de Maternología de la ciudad de León, a las cuales se realizó la toma de una manera sistemática.

Cada muestra fue acompañada de una ficha, extraída de la historia clínica, en la que se hicieron constar los siguientes datos:

Fecha:

Nombre:

Edad:

Estado Civil:

Última regla:

Primigrávida

N.º gestaciones anteriores

Multigrávida.

Sintomatología:

Leucorrea:

Prurito y escozor:

Vulvo-vaginitis:

Vulvo-vaginitis con aftas:

Otros datos:

3.1.1. Posición de la gestante (posición litotómica).

Para la obtención de las muestras se colocó a las gestantes en posición ginecológica diagnóstica, es decir, en decúbito supino, con ligera flexión del tronco, flexión y abducción de piernas y muslos y con los pies apoyados por los talones en los estribos de la mesa de exploración.

3.1.2. Técnica de la toma.

Previa inspección de genitales externos, se procedió a la introducción de un espéculo vaginal estéril, sin lubrificar, y con torunda de algodón seca, montada en

espátula de madera, esterilizada, en tubo de ensayo con tapón de algodón, a una atmósfera de presión durante 15 minutos, se realizó una impresión de los fondos de saco y paredes laterales de la vagina, evitando hacer tomas del cuello uterino.

3.2. CULTIVO, RECUENTO Y AISLAMIENTO.

3.2.1. Siembra.

La siembra de las muestras se efectuó lo más rápidamente posible después de su recogida, de forma que en ningún caso se dejó transcurrir un plazo superior a las dos horas. Con la torunda de algodón impregnada del inóculo, se realizó una extensión circular, rotando al mismo tiempo dicha torunda 360º sobre su eje, en toda la superficie de una placa de Petri, con el medio ya preparado.

En las 50 primeras muestras hemos utilizado como medios, agar malta y agar glucosa Sabouraud 4 % (Difco), (pH 5,6), adicionando al mismo, cloranfenicol a la dosis de 0,05 mg/ml del medio, para evitar el crecimiento bacteriano; sin embargo se observó que los resultados del crecimiento eran superiores en el agar Sabouraud que en el agar malta, y por lo tanto se escogió el primero como medio de elección, continuándose en el resto de las muestras exclusivamente con agar glucosado Sabouraud.

3.2.2. Recuento y aislamiento.

Las placas de Petri, una vez sembradas, se incubaron a 37º C durante 72 horas.

Transcurrido este tiempo, se procedió al recuento de colonias y aislamiento de las cepas representativas. Dicho aislamiento se llevó a cabo a partir de una sola colonia, sembrándola en picadura con un asa de platino acodada, en agar malta inclinado, en frascos de vidrio con tapón de rosca (vaccine bottles, Griffin & George).

Las cepas aisladas se mantuvieron a temperatura de laboratorio (18-20º C) hasta el momento de su tipificación, haciéndose una resiembra cada dos meses, con objeto de mantener su vitalidad.

3.3. TIPIFICACION*

En la tipificación de nuestras muestras, se han seguido las pautas indicadas por LODDER,³⁷ basadas en los siguientes criterios:

1. Características morfológicas. a) Características de reproducción vegetativa. b) Características de las células vegetativas.

* Las técnicas de tipificación se han realizado siguiendo la pauta general empleada en este laboratorio, pudiéndose leer con más detalle en el trabajo del que es autora Margarita REY FERNÁNDEZ titulado *Incidencia de levaduras en la leche de abasto de la provincia de León*, que se publica en este mismo volumen «(1972), 18, pág. 105 y siguientes».

2. Características de cultivo. a) Crecimiento en medio líquido. b) Crecimiento en medio sólido.
 3. Características sexuales. a) Formación de ascosporas.
 4. Características fisiológicas. a) Utilización de compuestos carbonados.
- I. Utilización fermentativa. II. Utilización oxidativa. b) Utilización de NO₃K.
5. Producción de tubos germinales.

1. Características morfológicas.

a) Características de reproducción vegetativa.

Se utilizó extracto de malta de la casa Boots (Inglaterra) a una concentración del 4 % y, esterilizado por filtración a través de Seitz de porosidad EK. Se sembraron 4 tubos por cepa, manteniéndose dos de ellos a 25º C, durante 72 horas, y los otros dos, durante 4 semanas a temperatura de laboratorio (18-20º C). Transcurrido este tiempo, se procedió a la observación microscópica directa, entre porta y cubre, de una gota de cultivo.

b) Características de las células vegetativas.

Se estudió su forma y tamaño, pero dichas características no tienen un gran valor en la identificación.

La formación de pseudomicelio se realizó sobre agar harina de maíz «Corn meal Agar» (Difco), por el método de cultivo en portaobjetos, comprobándose la formación, o no, de pseudomicelio, tanto debajo del cubre como en las zonas próximas al mismo. (Fig. 1 y 2).

La formación de clamidosporas se llevó a cabo en agar Czapek-Dox (Oxoid), el cual lleva glicerofosfato magnésico, producto sin el cual no tendría lugar la formación de clamidosporas (DAWSON¹⁷), más Tween 80 al 1 %, y realizándose la siembra en profundidad e incubándose a 25º C.

2. Características de cultivo.

Las características del cultivo no tienen gran valor taxonómico, aunque en algunos casos pueden servir para la diferenciación genérica.

a) Crecimiento en medio líquido.

Se utilizó extracto de malta, ya descrito previamente, haciéndose la observación a las 72 horas cuando el cultivo se mantuvo a 25º C y al mes cuando se mantenía a temperatura de laboratorio. Se comprobó la formación de película, anillo y sedimento.

b) Crecimiento en medio sólido.

Se empleó agar malta (Difco), incubándose a 25º durante 72 horas, observándose la forma, tamaño, tipo y color de las colonias.

3. Características sexuales.

a) Formación de ascosporas.

Se utilizó como medio de pre-esporalación agar malta y de esporulación agar Gorodkowa.

La composición del agar Gorodkowa es la siguiente: peptona, 10 g; glucosa, 1 g; ClNa, 5 g; agar (Oxoid n.º 3), 30 g; y agua destilada, 1.000 ml.

Se incubaban las levaduras a 25º C, llevándose a cabo una primera observación a los cuatro días. Las cepas que no esporularon se mantuvieron posteriormente a temperatura de laboratorio durante cuatro semanas, haciendo una observación semanal.

Los esporos se teñían por una modificación de la coloración de Wirtz, consistente en:

1. Extensión de una gota de suspensión de levaduras en agua destilada.
2. Secado al aire y fijación por el calor.
3. Tinción con verde malaquita al 1% (en solución acuosa de fenol al 1%, preparada sin calentar).
4. Lavado con agua durante 1 minuto, aproximadamente.
5. Tinción con safranina (solución acuosa 0,5% - durante 30 segundos).
6. Lavado y secado.

Por este procedimiento, los esporos se tiñen en verde y las formas vegetativas en rojo (fig. 3).

4. Características fisiológicas.

a) Utilización de compuestos de carbono.

I. Utilización fermentativa.

Se probaron los azúcares siguientes: Hexosas (D-Glucosa y D-Galactosa); disacáridos (Sacarosa, Maltosa, Lactosa y Trehalosa); trisacáridos (Rafinosa).

Como medio base se empleó agua de peptona Andrade (Oxoid), a la que se adicionó el azúcar correspondiente en una proporción del 2%, excepto en el caso de la rafinosa que lo fue al 4%.

Con las levaduras a tipificar se hacía una siembra doble por cada azúcar, cultivándose a 25º C durante una semana para comprobar la formación de ácido y gas.

II. Utilización oxidativa.

Se verificaron los compuestos carbonados siguientes: Pentosas (D-Xilosa, L-Arabinosa y L-Ramnosa); Hexosas (D-Glucosa, D-Galactosa, L-Sorbosa y Salicina); Disacáridos (Sacarosa, Maltosa, Melibiosa, Celobiosa, Trehalosa y Lactosa); Trisacáridos (Rafinosa y Melezitosa); Polisacáridos (Inulina y Almidón); Alcoholes (Eritritol, Ribitol (Adonitol), Galactitol (Dulcitol), D-Glucitol (Sorbitol), Mio-Inositol (Inositol) y D-Manitol); y Ácidos (D-L-ácido láctico y ácido cítrico).

Por el método auxonográfico se realizaban las pruebas de asimilación, en un

medio consistente en: PO₄KH₂, 1 g; SO₄Mg. 7H₂O, 0,5 g; SO₄(NH₄)₂, 0,5 g; agar (Oxoid n.º 3), 20 g; y agua destilada, 1.000 ml.

Los discos auxonográficos eran de papel de filtro muy absorbente y de unos 5 mm. de diámetro, impregnados de la solución del compuesto carbonado correspondiente; dicha solución en el caso de la glucosa fue de 5 g. por 100 ml. de agua destilada y en el de los demás compuestos, una cantidad tal, que llevaba un peso de carbono equivalente al que contendrían 5 g. de glucosa. Previo secado se esterilizaban en frascos de vidrio con tapón de rosca.

La siembra se realizaba en placas de Petri, consistiendo en 1 ml. de suspensión de levaduras en agua destilada estéril a la que posteriormente se añadían 20 ml. del medio de cultivo. Una vez solidificado el medio, se colocaban los discos (6 por placa), cultivándose a 25º C durante 1 semana y realizándose una lectura diaria.

Cuando el crecimiento alrededor del disco era similar al del resto de la placa se consideró negativo; si era más abundante en una zona de 5 mm. de radio, positivo débil; y si el radio era de 10 mm. o superior, positivo.

b) Utilización del NO₃K.

Se siguió igualmente la técnica del método auxonográfico, empleando un medio consistente en: PO₄KH₂, 1 g.; Glucosa, 20 g.; SO₄Mg 7H₂O, 0,5 g.; agar (Oxoid n.º 3), 20 g.; y agua destilada, 1.000 ml. Preparándose el medio de manera similar al de la asimilación de compuestos carbonados.

El inóculo y el medio se distribuían similarmente a lo descrito para la asimilación de compuestos carbonados. Una vez solidificado el medio, en un extremo de la placa se depositó NO₃K haciendo una estría con ayuda de un asa de platino longitudinal y en el opuesto, peptona, a fin de que sirviera como testigo de crecimiento, ya que ésta es fácilmente asimilada por las levaduras. La prueba se consideró positiva cuando el crecimiento alrededor de la peptona y el NO₃K, fue mayor que en el resto de la placa; negativa, cuando el halo de crecimiento sólo existió alrededor de la peptona. La prueba se repitió, cuando alrededor de la peptona no apareció halo de crecimiento.

5. Producción de tubos germinales.

Para la realización de esta prueba se utilizaron los sueros, estériles, siguientes: humano, bovino y de conejo.

Se distribuyeron 0,5 ml. de cada suero en tubos de hemólisis y se sembraron con asa de platino acodada, sirviendo de inóculo el vértice de una colonia; se incubaban a 37º C durante tres horas, haciendo una observación cada hora. Se consideró positiva la prueba cuando, al cabo de tres horas de incubación, se observó la filamentación de las células.

Se contaron en cada suero las células filamentadas presentes en un total de 500 células de levaduras, comparando posteriormente los distintos porcentajes en cada uno de ellos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. CLASIFICACION CLINICA DE LAS MUJERES GESTANTES.

De las 1.450 mujeres gestantes estudiadas, 449 (30,9 %) presentaron en el momento de la toma de muestras, diversa sintomatología, consistente en leucorrea o prurito que, en algunas de ellas, iban acompañados de vulvo-vaginitis, con o sin aftas. El resto (69 %) no presentó síntomas.

El número y frecuencia de las distintas manifestaciones señaladas anteriormente en relación con la paridad, así como en valores totales medios, puede observarse en el cuadro n.º 1.

Puede comprobarse que, aunque los resultados no son del todo superponibles, no existen variaciones clínicas significativas entre las mujeres primigrávidas o multígrávidas. Asimismo, la manifestación más frecuente fue la leucorrea (58,3 %), y la menos frecuente el prurito y escozor (7,3 %); la vulvo-vaginitis se presenta mucho más corrientemente sin aftas.

Corrientemente, los estudios realizados por los distintos investigadores hacen referencia a mujeres gestantes, que presentaron síntomas genitales, o que dieron previamente un aislamiento positivo a levaduras. Nosotros, realizamos un muestreo sistemático, por lo que nos ha sido posible clasificar a las mujeres en sintomáticas y asintomáticas, según presentaran, o no, manifestaciones clínicas.

En consecuencia, hemos comparado nuestros resultados con los de aquellos investigadores que realizaron asimismo una toma de muestras sistemáticas, aunque también, ocasionalmente, lo hemos efectuado con aquellos que lo hicieron de una manera selectiva. En relación con el primer caso, HALDE y ARAGON³¹ encontraron, en Filipinas, que el 19,2 % de las mujeres gestantes presentaron síntomas. AGÜERO y FEO,¹ en Venezuela, el 72 %. DAFTARY y col.¹⁴ en la India, el 37 % y JENNISON,³⁴

CUADRO N.º 1
Cuadro clínico.

Síntomas	PRIMIPARAS		MULTIPARAS		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Leucorrea ¹	101	59,4	161	57,7	262	58,3
Prurito ²	10	5,8	23	8,2	33	7,3
Vulvo-vaginitis ³	34	20	65	23,2	99	22
Vulvo-vaginitis ⁴ con aftas	25	14,7	30	10,7	55	12,2
Total	170	100	279	100	449	100

1: Aisladamente como único síntoma

2: Acompañado de escozor.

3: Inflamación de vulva y vagina con leucorrea, prurito, escozor, dolor, disuria y coitalgia.

4: Como en el apartado 3, pero con AFTAS.

en Inglaterra, el 16 y 17 %, correspondiendo a dos comunicaciones referentes a distinto año. El 30,9 % de las 1.450 mujeres gestantes estudiadas por nosotros, presentaron síntomas, resultando este porcentaje próximo al obtenido por DAFTARY y col.¹⁴ superior a los hallados por HALDE y ARAGON³¹ y JENNISON³⁴ y muy inferior al comunicado por AGÜERO y FEO.¹ La gran diferencia existente entre los porcentajes de mujeres gestantes sintomáticas obtenidos por AGÜERO y FEO¹ y nosotros, aunque, en cierto modo, pudiera atribuirse al clima, parece más lógico que guarde relación con el nivel económico-social del material humano, ya que dichos investigadores partieron de mujeres de bajo estrato social, en tanto que nosotros partimos de mujeres de un nivel social medio.

En general, la mayoría de los autores no comunicaron cifras relativas al número y frecuencia de las distintas manifestaciones clínicas observadas en las mujeres gestantes sintomáticas, sino que se limitaron a citarlas por orden de importancia. Por lo que se refiere a aquellos que dieron cifras acerca de la frecuencia de algunos de los síntomas, recogemos las de HALDE y ARAGON,³¹ quienes hallaron en Filipinas que el 30,3 % de las mujeres gestantes sintomáticas tenía vulvo-vaginitis y el 9 %, prurito vulvar, así como las de SIMONE,⁵² quien encontró en Argentina que el 75 % presentaba vulvo-vaginitis y el 3,5 %, prurito vulvar.

Nuestros resultados (vulvo-vaginitis con o sin aftas, 34,2 % y prurito vulvar, 7,3 %, están de acuerdo, en líneas generales, con los de HALDE y ARAGÓN,³¹ en cambio, se separan notoriamente de los de SIMONE,⁵² que obtuvo una frecuencia de vulvo-vaginitis aproximadamente de doble magnitud que la nuestra, mientras que la de prurito vulvar fue aproximadamente la mitad. Estas diferencias pudieran explicarse teniendo en cuenta la distinta naturaleza de la investigación, puesto que dicho autor la realizó selectivamente y nosotros de forma sistemática.

Respecto a la presentación de aftas, existe unanimidad en el criterio de los distintos investigadores acerca de su escasa frecuencia, aunque comunicándose distintos valores. BITTENCOURT y CAMARA,⁸ de 224 mujeres gestantes y no gestantes, descubrieron un solo caso con aftas. GARNIER²⁴ en mujeres no gestantes, el 2,3 %. PEREIRO MIGUENS,⁴⁷ un caso entre 17 gestantes. SIMONE,⁵² el 3,5 %. Y nosotros, el 12,2 %. Aún dentro de estos estrechos valores, nuestra cifra es la de mayor magnitud.

4.2. AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y SU RELACION CON LOS DIFERENTES PARAMETROS CLINICOS.

4.2.1. Frecuencia total.

De 1.450 muestras recogidas a partir del mismo número de mujeres gestantes, se obtuvieron 278 aislamientos positivos de levaduras (19,1 %).

En el cuadro n.º 2 se expresan los valores obtenidos por distintos investigadores y por nosotros, pudiéndose observar, que los primeros oscilan entre amplios lími-

CUADRO N.º 2

Frecuencia de aislamientos positivos de levaduras en investigación sistemática.

Autor y año	País	N.º muestras	aislamientos +	%
CARTER y col. ¹³ (1941)	EE. UU.	200	33	33
RAURAMIO (1) (1948)	Finlandia	—	—	25
BITTENCOURT y col. ¹ (1956)	Brasil	117	81	69
HALDE y col. ³¹ (1956)	Filipinas	171	44	25,7
APARICIO GARRIDO y col. ⁶ (1959)	España	241	77	31
DE LA FUENTE y col. ²² (1959)	España	46	—	30,5
ROLDAN ⁵⁰ (2) (1959)	España	149	17	11,3
GALINOVIC WEISGLASS ²³ (1960)	Yugoslavia	107	28	26,1
GILLESPIE ²⁷ (1960)	EE. UU.	259	121	46
MÉNON y col. ⁴¹ (1960)	India	292	119	40,8
HABERMAN ³⁰ (1962)	EE. UU.	103	27	26
ACÜERO y col. ¹ (1963)	Venezuela	200	57	28,5
DAFTARY y col. ¹⁴ (1963)	India	100	38	38
O'BRIEN ⁴⁴ (1964)	Canadá	336	64	19
JACKSON ³³ (1966)	EE. UU.	668	223	33,6
ROBINSON ⁵¹ (1967)	Canadá	423	72	17
DAVIS ¹⁵ (1968)	EE. UU.	185	19	10
Nosotros	España	1.450	278	19,1

1: Cit. por TIMONEN.⁵⁵

2: No hace cultivos. Realiza examen microscópico de frotis.

tes (11,3 y 69 %). Los más próximos a nosotros son los obtenidos por O'BRIEN ⁴⁴ (19 %) y ROBINSON y col.⁵¹ (17 %) y el más distante el de BITTENCOURT y CAMARA ⁸ (69 %). En este último caso, se considera bastante lógica la elevada incidencia de levaduras, por tratarse de una investigación referida a un país tropical.

Si comparamos la frecuencia obtenida por nosotros con las comunicadas por los otros tres investigadores de nuestro país, que figuran en el cuadro n.º 2 podemos señalar que ha sido superior a la de ROLDAN DE CASTRO,⁵⁰ pero hay que tener en cuenta que este autor, en su metódica, utilizó el examen microscópico de frotis, en vez de cultivo, y es de todos conocida la superioridad de este último procedimiento para el diagnóstico de levaduras. Asimismo, fue inferior a las de APARICIO GARRIDO y PEÑA YÁÑEZ ⁶ y DE LA FUENTE y col.²² aunque, en general, no debe olvidarse que las diferencias de frecuencia pueden depender, lógicamente, de una serie de factores como pueden ser el clima, el estado social, la técnica de la investigación, la magnitud del muestreo, etc.

4.2.2. Frecuencia en relación con la paridad.

De las 1.450 mujeres gestantes estudiadas, 540 fueron primigrávidas y 910 multigrávidas. En el cuadro n.º 3 se observan los valores correspondientes al número y frecuencia de aislamientos positivos de levaduras, en relación con la paridad, comprobándose que no existen diferencias apreciables en los dos grupos citados.

CUADRO N.º 3

Frecuencia en relación con la paridad (total)

PRIMIGRAVIDAS			MULTIGRAVIDAS			TOTAL		
N.º muestras	+	%	N.º muestras	+	%	N.º muestras	+	%
540	106	19,6	910	172	18,9	1.450	278	19,1

Dentro de la escasez de trabajos existentes en la bibliografía, hemos consultado los correspondientes a DE LA FUENTE y col.²² en España, SPITZBART ⁵⁸ en Alemania y DAFTARY y col.¹⁴ en la India. Estamos de acuerdo con dichos investigadores, en admitir que la paridad no es factor que influya en la incidencia de levaduras. Sin embargo, ACÜERO y FEO,¹ en Venezuela, obtuvieron aislamientos positivos más frecuentemente en primigrávidas (34,5 %), que en multigrávidas (26,2 %), llamando la atención sobre ello. No obstante teniendo en cuenta la ligera diferencia y nuestros resultados, ratificamos nuestra opinión de que la paridad no debe jugar un papel importante en la frecuencia de la infección por levaduras.

4.2.3. Frecuencia en relación con la presencia o ausencia de síntomas clínicos.

A partir de las 449 muestras procedentes de las mujeres gestantes con sintomatología, obtuvimos 166 aislamientos positivos de levaduras (36,9%). En cambio, de las 1.001 muestras procedentes de las mujeres que no tuvieron síntomas, únicamente se aislaron 112 (11,1%). Estos valores, así como los números y frecuencias de aislamientos positivos en relación con la paridad, pueden observarse en el cuadro número 4.

CUADRO N.º 4

Frecuencia en relación con la sintomatología (según paridad)

	SINTOMATICAS			ASINTOMATICAS		
	N.º muestras	+	%	N.º muestras	+	%
Primigrávidas	170	66	38,8	370	40	10,8
Multigrávidas	279	100	35,8	631	72	11,4
TOTAL	449	166	36,9	1.001	112	11,1

Se comprueba que el porcentaje de aislamiento es mucho más alto en las muestras procedentes de mujeres gestantes con síntomas y que no existen diferencias apreciables en relación con la paridad.

Para su comparación con los porcentajes encontrados por otros investigadores, que, a su vez, hicieron un estudio sistemático, hemos recopilado los valores corres-

pondientes en el cuadro n.º 5. Puede observarse, que en todos los casos existió una mayor frecuencia de aislamientos positivos a partir de las muestras procedentes de mujeres con síntomas; que la frecuencia obtenida por nosotros en éstas concuerda con las que obtuvieron HALDE y ARACON³¹ y AGÜERO y FEO¹ y se separa de modo importante de la de DAFTARY y col.¹⁴, diferencia que pudiera explicarse, teniendo en cuenta que estos últimos investigadores realizaron los estudios únicamente sobre 100 mujeres que se encontraban en el segundo trimestre de gestación, momento en el que suele ser más constante el aislamiento de levaduras; y que las frecuencias de aislamiento positivo en las muestras procedentes de mujeres asintomáticas, oscilaron en todos los casos dentro de unos límites estrechos.

CUADRO N.º 5

Frecuencia de aislamientos positivos en relación con la sintomatología

	SINTOMÁTICAS			ASINTOMÁTICAS		
	N.º muestras	Aislamiento +	%	N.º muestras	Aislamiento +	%
HALDE y col. ³¹ (1956)	33	13	39,3	138	31	22,3
AGÜERO y col. ¹ (1963)	37	46	33,5	54	8	15
DAFTARY y col. ¹⁴ (1963)	37	23	62	63	15	23
Nosotros	449	166	36,9	1.001	112	11,1

Para su comparación con los porcentajes encontrados por otros investigadores, que, en cambio, realizaron un estudio selectivo, hemos recogido los datos correspondientes en el cuadro n.º 6. Puede verse que, nuestra frecuencia (36,9 %) está muy próxima a la obtenida por CANESE¹² (34,6 %), en Paraguay, y que los restantes fueron superiores en mayor o menor grado, oscilando entre 39,3 % y 89,4 %. A este respecto, pensamos que las frecuencias obtenidas a partir de las investigaciones selectivas lógicamente debían ser más elevadas.

CUADRO N.º 6

Frecuencia de aislamientos positivos en investigación selectiva (mujeres gestantes sintomáticas)

Autor y año	País	N.º muestras	Aislamiento +	%
CANESE ¹² (1959)	Paraguay	635	—	34,6
TAUBERT y col. ⁵⁴ (1959)	EE. UU.	67	41	61,2
SPITZBART ⁵³ (1960)	Alemania	292	119	40,8
GONZÁLEZ-OCHOA y col. ²⁸ (1963)	Méjico	201	79	39,3
MAHGOUB y col. ⁴⁰ (1967)	India	25	14	56
GIARDINELLI y col. ²⁶ (1968)	Italia	45	37	80
KUCHARCZYK ³⁶ (1968)	Polonia	132	118	89,4
BONFANTE-GARRIDO y col. ⁹ (1969)	Venezuela	170	79	46,5
Nosotros	España	449	166	36,9

4.2.3.1. Frecuencia en relación con las distintas manifestaciones clínicas.

El número y frecuencia de aislamientos positivos de levaduras, en las 449 muestras de mujeres gestantes que presentaron síntomas, oscilaron en relación con las distintas manifestaciones clínicas y sus valores, lo cual queda reflejado en el cuadro n.º 7. Puede observarse que la vulvo-vaginitis con aftas, es la manifestación clínica que presentó mayor porcentaje de aislamientos positivos (85,4 %) y la leucorrea, el menor (24,4 %); igualmente, no existen diferencias apreciables en relación con la paridad.

CUADRO N.º 7

Frecuencia en relación con las distintas manifestaciones clínicas (total y según paridad)

Síntomas	PRIMIGRAVIDAS			MULTIGRAVIDAS			TOTAL		
	N.º	+	%	N.º	+	%	N.º	+	%
Leucorrea	101	25	24,7	161	39	24,2	262	64	24,4
Prurito	10	3	30	23	7	30,4	33	10	30,3
Vulvo-vaginitis	34	16	47	65	29	44,6	99	45	45,4
Vulvo-vaginitis con aftas	25	22	88	30	25	83,8	55	47	85,4

A este respecto se reseña que no hemos podido recoger datos valorables para comparar nuestros resultados.

4.2.4. Frecuencia en relación con los distintos períodos de la gestación.

A fin de observar la posible variación en la incidencia de levaduras con arreglo al momento de la gestación, se ha seguido la pauta de establecer tres períodos dentro del embarazo, lo cual nos ha permitido comparar nuestros resultados con los de otros investigadores que han seguido este mismo criterio. Los datos correspondientes figuran en el cuadro n.º 8 en el que puede verse cómo las frecuencias de aislamiento correspondientes al segundo y tercer trimestre (20,2 y 20,1 % respectivamente), presentan unos valores similares y algo más elevados que en el primero (15,5 %).

CUADRO N.º 8

Frecuencia total en los distintos períodos del embarazo

	N.º muestras	+	%
1er. trimestre	327	51	15,5
2.º trimestre	483	98	20,2
3er. trimestre	640	129	20,1

En el cuadro n.º 9, puede comprobarse, que la frecuencia de aislamientos positivos en cada uno de los tres trimestres de la gestación, no presenta diferencias apreciables en relación con la paridad.

CUADRO N.º 9

Frecuencia en los distintos períodos del embarazo en orden a la paridad.

	PRIMIGRAVIDAS			MULTIGRAVIDAS		
	N.º muestras	+	%	N.º muestras	+	%
1er trimestre	116	19	16,3	211	32	15,1
2.º trimestre	183	37	20,2	300	61	20,2
3er trimestre	241	50	20,7	399	79	19,7

En el cuadro n.º 10, puede observarse cómo la frecuencia de aislamiento de levaduras en las mujeres gestantes que presentaron síntomas, aumenta a medida que avanza la gestación, oscilando entre el 27,3 % en el primer trimestre y el 40,6 % en el tercer trimestre, mientras que, en las mujeres asintomáticas, las frecuencias en los tres trimestres tuvieron valores muy próximos.

CUADRO N.º 10

Frecuencia en los distintos períodos del embarazo en orden a la sintomatología.

	SINTOMÁTICAS			ASINTOMÁTICAS		
	N.º muestras	+	%	N.º muestras	+	%
1er. trimestre	84	23	27,3	243	28	11,5
2.º trimestre	156	58	37,1	327	40	12,2
3er. trimestre	209	85	40,6	431	44	10,2

GRASSET y col.²⁹ comunicaron que la aparición de levaduras suele ocurrir hacia el cuarto y quinto mes. MENON y JEHAN⁴¹ descubrieron un aumento progresivo en los tres trimestres, y DAFTARY y col.¹⁴ que sólo realizaron estudios en el segundo trimestre, hallaron una frecuencia del 38 %.

No estamos de acuerdo con GRASSET y col.²⁹ pues nosotros conseguimos el 15,5 % de aislamientos ya en el primer trimestre. Tampoco observamos una variación progresiva como MENON y JEHAN,⁴¹ pues si bien es cierto que aumentó del primero al segundo trimestre (15,5 y 20,2 %, respectivamente), no ocurrió lo mismo en el tercero (20,1 %). En cuanto a DAFTARY y col.¹⁴ que limitaron su investigación al segundo trimestre, obtuvieron una frecuencia superior a la nuestra en el mismo período (38 % y 20,2 %, respectivamente).

4.2.5. Frecuencia en relación con el estado civil.

De las 1.450 mujeres gestantes estudiadas, 1.446 fueron casadas y 4 solteras; en las muestras procedentes de estas últimas, no se obtuvo ningún aislamiento de levaduras.

En relación con este condicionamiento, no se considera suficientemente significativo, dada la escasa casuística.

4.2.6. Frecuencia en relación con la edad.

La edad de las mujeres gestantes, en el momento de la toma de muestras, osciló entre los 16 y 45 años, estableciéndose para una más clara exposición de los resultados, seis grupos con diferencias de edades de cinco años, a fin de observar la posible existencia de una variación en la frecuencia de aislamiento de levaduras, en relación con las distintas edades.

En el cuadro n.º 11 puede observarse que, las frecuencias tienen unos valores muy próximos, oscilando entre el 17,6 % en el grupo de mujeres de 16 a 20 y de 31 a 35 años y el 22,2 % en el de 36 a 40.

CUADRO N.º 11

Frecuencia en relación con la edad

Años	N.º muestras	+	%
16-20	85	15	17,6
21-25	524	101	19,2
26-30	393	75	19
31-35	226	40	17,6
36-40	157	35	22,2
41-45	65	12	18,4

Compartimos la opinión de GILLESPIE y col.,²⁷ DAFTARY y col.¹⁴ y NAGESKA y ANATHAKRISHNA,⁴³ los cuales comunicaron que la presencia de levaduras en vagina no guarda relación con la edad.

4.2.7. Frecuencia en relación con los meses del año.

Los datos relativos al número y porcentaje de aislamientos de levaduras a lo largo de los doce meses del año, figuran en el cuadro n.º 12. Puede comprobarse que, la frecuencia de aislamiento ofrece escasa variación en relación con los distintos meses, oscilando entre el 14,5 % en el mes de enero y el 25,3 % en el de marzo.

CASTELLANI y TAYLOR (cit. por BITTENCOURT y CAMARA⁸) opinan que las micosis vaginales son más frecuentes en los climas tropicales y que experimentan exacerbaciones en verano. STOUE y BLANK (cit. por AGÜERO y FEO¹) son de la misma opi-

CUADRO N.º 12
Frecuencia en relación con los meses del año

Meses	N.º muestras	+	%
Enero	137	20	14,5
Febrero	132	25	18,9
Marzo	130	33	25,3
Abril	109	24	22
Mayo	110	18	16,3
Junio	89	13	14,6
Julio	99	19	19,1
Agosto	112	22	19,6
Septiembre	133	27	20,3
Octubre	106	22	20,7
Noviembre	170	26	15,2
Diciembre	123	29	23,5

nión, ya que refieren que la frecuencia de aislamientos de levaduras es más elevada en los países de clima tropical, y durante el verano en los de clima continental.

En relación con el factor clima, teniendo en cuenta que realizamos la investigación bajo un clima continental, no podemos establecer comparación de los resultados de los autores citados. En cuanto al aumento de los aislamientos durante el verano en los de clima continental que ellos afirman, nosotros no lo hemos confirmado en nuestras condiciones. No encontramos una explicación para interpretar estos resultados tan variantes, aunque entendemos que las condiciones de micro-hábitat de la vagina no deben guardar relación estrecha con las variaciones ambientales del macro-clima.

4.3. RECUENTO DE COLONIAS.

El recuento del número de colonias en nuestras placas de cultivo, varió según que los inóculos procedieran de mujeres gestantes sintomáticas o asintomáticas.

A efectos de conseguir una mayor claridad en la interpretación de los recuentos, se encuadraron en tres grupos según que el número de colonias oscilara de 1 a 100, de 101 a 500 y de 501 a un crecimiento confluente. Los valores correspondientes a los contajes pueden observarse en los cuadros núms. 13, 14 y 15.

Puede comprobarse, que el porcentaje más frecuente desde un punto de vista general, corresponde a recuentos de hasta 100 colonias (45,6 %); que no existen diferencias apreciables en relación con la paridad, y que la mayor o menor magnitud de los recuentos de colonias, está en relación directa con la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas, respectivamente. De forma que, con los inóculos procedentes de las mujeres gestantes con síntomas, se obtuvieron crecimientos confluentes más frecuentemente, mientras que con los de las mujeres asintomáticas predominaron los crecimientos de 1 a 100 colonias.

CUADRO N.º 13
Recuento de colonias

N.º colonias	N.º muestras	%
1-100	127	45,6
101-500	56	20,1
501-confluentes	95	34,1

Evidentemente, aunque la recogida de muestras se procuró que fuera siempre uniforme, no puede dejar de notarse la segura influencia que ha podido tener en el número de colonias, la existencia de una mayor cantidad de flujo, reflejo de un proceso inflamatorio, en el caso de las mujeres gestantes sintomáticas.

CUADRO N.º 14
Recuento de colonias según paridad

N.º colonias	PRIMIGRAVIDAS		MULTIGRAVIDAS	
	N.º muestras	%	N.º muestras	%
1-100	48	45,2	79	45,9
101-500	20	18,8	36	20,9
501-confluentes	38	35,8	57	33,1

En relación con la paridad no hemos encontrado datos bibliográficos para comparar nuestros resultados. Respecto a la presencia o ausencia de síntomas, Rico y col.⁴⁹ señalaron que no existía una estrecha relación entre la cantidad de colonias y los síntomas, por lo cual nuestros resultados no concuerdan con los de estos investigadores. A este respecto, consideramos que la no observancia de la relación número de colonias/síntomas, pudiera depender del escaso número de muestras estudiadas por ellos (24 casos).

CUADRO N.º 15
Recuento de colonias según sintomatología.

N.º colonias	SINTOMATICAS		ASINTOMATICAS	
	N.º muestras	%	N.º muestras	%
1-100	54	32,5	73	65,1
101-500	33	19,8	23	20,5
501-confluentes	79	47,5	16	14,2

4.4. FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS GENEROS Y ESPECIES Y SU RELACION CON LOS DIFERENTES PARAMETROS CLINICOS.

Las diversas cepas aisladas se clasificaron en los tres géneros siguientes: *Candida*, *Torulopsis* y *Saccharomyces*. En el cuadro n.º 16 figuran las respectivas frecuencias, siendo la más alta la correspondiente al género *Candida* (91,3 %) y mucho menos importantes, las relativas a los géneros *Torulopsis* y *Saccharomyces* (7,5 y 1 %, respectivamente).

CUADRO N.º 16
Clasificación por géneros.

Géneros	N.º cepas	%
<i>Candida</i>	254	91,3
<i>Torulopsis</i>	21	7,5
<i>Saccharomyces</i>	3	1
TOTAL	278	100

En el cuadro n.º 17 figuran la relación de géneros hallados por distintos investigadores y por nosotros. Puede verse que el género *Candida* fue aislado por todos. Que la mayoría ^{8, 9, 12, 14, 25, 42, 53}, encontró solamente dicho género. Y que algunos identificaron hasta tres ³⁶ o cuatro ²³ géneros distintos, figurando en ambos casos los mismos hallados por nosotros. Puede deducirse de la frecuencia específica, ya que

CUADRO N.º 17
Géneros encontrados por diversos investigadores.

	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulopsis</i>
CARTER y col. ¹³ (1940)	+	+	—	+	—
BITTENCOURT y col. ⁸ (1956)	+	—	—	—	—
HALDE y col. ³¹ (1956)	+	+	—	+	—
GALINOVIC-WEIGLASS y col. ²³ (1956)	+	—	+	+	+
PEREIRO MIGUENS ⁴⁷ (1960)	+	—	+	—	+
SPITZBART ⁵³ (1960)	+	—	—	—	—
ACÚERO y col. ¹ (1963)	+	—	—	—	+
DAFTARY y col. ¹⁴ (1963)	+	—	—	—	—
GONZÁLEZ-OCHOA y col. ²⁸ (1963)	+	—	+	+	—
CANESE ¹² (1966)	+	—	—	—	—
GATTI y col. ²⁵ (1966)	+	—	—	—	—
GIARDINELLI y col. ²⁶ (1968)	+	—	—	—	+
KUCHARCZYK ³⁶ (1968)	+	—	—	+	+
MAHCOUB ⁴⁰ (1968)	+	—	—	—	+
BONFANTE y col. ⁹ (1969)	+	—	—	—	—
FEÓ ²¹ (1969)	+	—	—	—	+
MIERZEJEWSKI ⁴² (1969)	+	—	—	—	—
Nosotros	+	—	—	+	+

no comunicaron la genérica, que el género *Candida* tuvo, al igual que en nuestros resultados, una mayor incidencia.

CUADRO N.º 18
Clasificación por especies

Especies	N.º cepas	%
<i>Candida albicans</i>	236	84,8
<i>C. clausenii</i>	8	2,8
<i>C. tropicalis</i>	5	1,7
<i>C. krusei</i>	3	1
<i>C. lusitania</i>	2	0,7
<i>Torulopsis glabrata</i>	21	7,5
<i>Sacch. cerevisiae</i>	3	1
TOTAL	278	100

Las 278 cepas, una vez identificadas, correspondieron a las siguientes especies: *Candida albicans* (fig. 4), *C. clausenii*, *C. tropicalis* (fig. 5), *C. krusei*, *C. lusitania*, *Torulopsis glabrata* (fig. 6) y *Saccharomyces cerevisiae*.

El número y la frecuencia de las distintas especies puede observarse en el cuadro n.º 18. Se comprueba que la incidencia de *C. albicans* es muy elevada (84,8 %), siguiéndola a gran distancia, en orden de frecuencia, *T. glabrata* (7,5 %).

En el cuadro n.º 19, hemos recogido la relación de especies halladas por distintos investigadores y por nosotros, pudiendo comprobarse que *C. albicans* ha sido aislada por todos y *C. tropicalis* y *C. krusei* por la mayoría de ellos.

Respecto a la frecuencia de cada una de las especies, la mayoría de los investigadores ^{1, 31, 53} obtuvieron unos resultados que concuerdan con los nuestros, puesto que también hallaron un porcentaje más elevado de *C. albicans* que de las restantes especies. Sin embargo, BITTENCOURT y CAMARA ⁸ comunicaron que las especies más frecuentes halladas por ellos fueron *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Estos autores son los únicos, dentro de la bibliografía consultada por nosotros, que dan una frecuencia superior para estas especies que para *C. albicans*. Para GIARDINELLI y TINETTI, ²⁶ la más frecuente fue *T. candida*, aunque este hallazgo puede no constituir una excepción, si se acepta la hipótesis de dichos investigadores, sobre la consideración de que *T. candida* sea una mutación o simplemente una variación del ciclo biológico de una estirpe original de *C. albicans*.

En relación con las restantes especies aisladas por nosotros, su frecuencia oscila entre el 7,5 % y el 0,7 % para *T. glabrata* y *C. lusitania*, respectivamente. Compartimos la opinión de MAHCOUB ⁴⁰ en relación a que *T. glabrata* es la especie aislada en vagina con mayor frecuencia, después de *C. albicans*.

La mayoría de los investigadores han aislado *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Saccharomyces cerevisiae* con una frecuencia similar a la nuestra.

CUADRO N.º 19
Especies encontradas por diversos investigadores

	C. a	C. c	C. g	C. h	C. i	C. k	C. l	C. lo	C. m	C. pk	C. p	C. ps	C. r	C. s	C. t	C. u	C. r	Rh.	R. r.	Sa.	S. c	S. f	To.	T. c	T. g	T. f	T. i
CARTER y col. ¹³ (1940).	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BITTENCOURT y col. ⁸ (1956)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HALDE y col. ³¹ (1956)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GALINOVIC-WEISGLASS y col. ²³ (1960)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PERERO MIGUENS ³⁷ (1960)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SPITZBART ⁵³ (1960)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
AGIERO y col. ¹ (1963)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DATTARY y col. ¹⁴ (1963)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GONZÁLEZ-OCHOA y col. ²⁸ (1963)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CANESE ¹² (1966)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GATTI y col. ²⁵ (1966)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GIARDINELLI y col. ³⁶ (1968)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KUCHARCZYK ³⁶ (1968)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MARCOU ⁴⁰ (1968)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BONFANTE y col. ⁹ (1969)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
FEÓ ²¹ (1969)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MIREZLEWSKI ⁴² (1969)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nuevos																											
C. a = <i>C. albicans</i> ; C. c = <i>C. clausenii</i> ; C. g = <i>C. guilliermondii</i> ; C. h = <i>C. humicola</i> ; C. i = <i>C. intermedia</i> ; C. k = <i>C. krusei</i> ; C. l = <i>C. lusitania</i> ; C. m = <i>C. longitarsis</i> ; C. pk = <i>C. parakrusei</i> ; C. p = <i>C. parapsilosis</i> ; C. ps = <i>C. pseudotropicalis</i> ; C. r = <i>C. rugae</i> ; C. s = <i>C. tropicalis</i> ; C. t = <i>C. testacea</i> ; C. u = <i>C. utilis</i> ; Cr. = <i>Cryptococcus</i> sp.; Rh. = <i>Rhodotorula</i> sp.; R. r = <i>Rhizopora</i> (<i>Rh.</i> <i>mucilaginosa</i>); Sa. = <i>Saccharomyces</i> sp.; S. c = <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; S. f = <i>Sacch. fragilis</i> ; To. = <i>Torulopsis</i> sp.; T. c = <i>T. candida</i> ; T. g = <i>T. glabrata</i> ; T. f = <i>T. famata</i> ; T. i = <i>T. intermedia</i> ; C. m = <i>C. meionectica</i> .																											

No se han encontrado referencias bibliográficas sobre el aislamiento de *C. clausenii*, a excepción de un solo caso citado por FEÓ.²¹ A este respecto, hemos de tener en cuenta que nosotros consideramos como tal especie, aquellas cepas que primitivamente fueron tipificadas como *C. albicans* y posteriormente dieron resultado negativo a las pruebas de formación de clamidosporas y producción de tubos germinales. Probablemente haya pasado inadvertida la presencia de *C. clausenii* confundida con *C. albicans*, dado que muchos autores no han realizado las pruebas diferenciales citadas.

Por lo que se refiere a *C. lusitania* tampoco se han encontrado referencias sobre su aislamiento por otros autores a partir de muestras vaginales. Debido a esto, y a que sólo la hemos aislado en dos ocasiones, consideramos su hallazgo de escaso valor.

Una especie no aislada por nosotros, objeto de gran controversia, ha sido *C. stellatoidea*. Algunos autores la consideran de una frecuencia elevada,^{8, 12, 25} mientras que otros no hacen alusión a ella. GATTI y ACCIGLIARO²⁵ opinan que, el hecho de no describirla, sea debido a que muchos autores la consideran como una variedad de *C. albicans*. Sin embargo, siguiendo el criterio de LODDER,³⁷ creemos debe admitirse como dos especies distintas.

4.4.1. Frecuencia en relación con la paridad.

Los valores correspondientes al número y frecuencia de las distintas especies de levaduras en relación con la paridad, quedan reflejados en el cuadro n.º 20. Puede observarse, que todas las especies, a excepción de *C. lusitania* que sólo se aisló de mujeres gestantes multigrávidas, no presentaron diferencias apreciables en su frecuencia en relación con el factor paridad. Resultado, que concuerda con lo que hemos manifestado en el apartado 4.2.2.

CUADRO N.º 20
Frecuencia de especies según paridad

Especies	PRIMIGRAVIDAS		MULTIGRAVIDAS	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%
<i>Candida albicans</i>	95	89,6	141	81,9
<i>C. clausenii</i>	2	1,8	6	3,4
<i>C. tropicalis</i>	2	1,8	3	1,7
<i>C. krusei</i>	1	0,9	2	1,1
<i>C. lusitania</i>	—	—	2	1,1
<i>Torulopsis glabrata</i>	5	4,7	16	9,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,9	2	1,1
TOTAL	106	100	172	100

4.4.2. Frecuencia en relación con la presencia o ausencia de síntomas clínicos.

Los valores correspondientes al número de las distintas especies aisladas, así como las frecuencias absoluta y relativa de las mismas, teniendo en cuenta la procedencia de mujeres gestantes sintomáticas o asintomáticas, quedan reflejados en los cuadros núms. 21 y 22. Puede comprobarse que, las frecuencias de *C. albicans*, *C. krusei* y *Sacch. cerevisiae*, son superiores en las mujeres gestantes que presentaron síntomas y que, las de *C. clausenii*, *C. tropicalis* y *T. glabrata*, en aquellas que no los exhibieron. Igualmente, que la especie *C. albicans* es la de más elevada incidencia, tanto en las muestras positivas de mujeres gestantes sintomáticas como asintomáticas (94 % y 71,4 %, respectivamente). Es de señalar que *C. lusitania* solo se aisló de muestras procedentes de mujeres asintomáticas.

Por lo que respecta a *C. albicans*, nuestros resultados están de acuerdo con los de DAFTARY y col.,¹⁴ quienes la aislaron también con mayor frecuencia, tanto en mujeres gestantes sintomáticas como asintomáticas. Sin embargo, están particularmente de acuerdo con los de HALDE y ARAGON,³¹ ya que obtuvieron la mayor frecuencia para esta especie únicamente en mujeres gestantes sintomáticas, mientras que la obtuvieron igual o menor que la de otras del mismo género, en las mujeres asintomáticas.

En relación con *C. clausenii*, no podemos comparar nuestros resultados, dado que en la bibliografía consultada, solamente aparece el aislamiento de una cepa por FEO.²¹

Al igual que nosotros, DAFTARY y col.¹⁴ aislaron también, *C. tropicalis* más frecuentemente en mujeres gestantes asintomáticas que sintomáticas.

Por lo que se refiere a *C. krusei*, nuestros resultados no concuerdan con los de otros investigadores,^{14,31} ya que estos la aislaron solamente de muestras procedentes de mujeres gestantes asintomáticas.

C. lusitania, a la cual ya se ha hecho alusión en otros apartados (4.4. y 4.4.1.),

CUADRO N.º 21
Frecuencia absoluta de especies según sintomatología

Especies	SINTOMATICAS		ASINTOMATICAS	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%
<i>Candida albicans</i>	156	94	80	71,4
<i>C. clausenii</i>	1	0,6	7	6,2
<i>C. tropicalis</i>	1	0,6	4	3,5
<i>C. krusei</i>	2	1,2	1	0,8
<i>C. lusitania</i>	—	—	2	1,7
<i>Torulopsis glabrata</i>	4	2,4	17	15,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	1,2	1	0,8
TOTAL	166	100	112	100

hemos de considerarla como un mero hallazgo, puesto que su aislamiento sólo se efectuó en dos ocasiones y a partir de mujeres gestantes asintomáticas.

En relación con *T. glabrata*, que fue aislada por nosotros en segundo lugar, tanto de las muestras de mujeres gestantes sintomáticas como asintomáticas, nuestros resultados concuerdan con los de MAHCOUB,⁴⁰ solamente en lo referente a mujeres gestantes sintomáticas; en mujeres gestantes asintomáticas, otros autores,^{21,23} también aislaron dicha especie, aunque no en el mismo orden de frecuencia que nosotros.

Respecto a *Sacch. cerevisiae*, HALDE y ARAGÓN,³¹ aislaron esta especie solamente a partir de mujeres gestantes asintomáticas. No encontramos una explicación a la discordancia entre los hallazgos de estos investigadores y los nuestros; pero debido al escaso número de aislamientos efectuados por nosotros (tres cepas) y a estar considerada como saprofita, creemos que pudiera existir algún otro factor etiológico desencadenante de la sintomatología.

4.4.2.1. Frecuencia en relación con las distintas manifestaciones clínicas.

Los valores correspondientes a los aislamientos positivos para las distintas especies de levaduras, en relación con los cuatro grupos de manifestaciones clínicas establecidas, figuran en el cuadro n.º 23.

Puede comprobarse que el aislamiento de *C. albicans* se obtuvo de todos los grupos, correspondiendo la mayor frecuencia a las muestras de mujeres gestantes que presentaron vulvo-vaginitis con aftas (85,4 %) siguiéndole en sentido decreciente la vulvo-vaginitis (45,4 %), el prurito (30,3 %) y por último, la leucorrea (20,6 %). Se observa que, cuanto mayor fue la gravedad de los síntomas, tanto mayor fue la frecuencia con que se aisló *C. albicans*.

Asimismo, se comprueba que los aislamientos de las otras especies, sólo se obtuvieron en pequeña magnitud y únicamente de las muestras de mujeres que presentaron leucorrea, a excepción de *C. lusitania*, que no se observó a partir de las mujeres con manifestaciones clínicas.

No hemos podido recoger datos valorables en la bibliografía consultada, para comparar nuestros resultados en relación con la frecuencia de las diferentes especies de levaduras aisladas en las mujeres gestantes con diferentes manifestaciones clínicas. No obstante, en relación con mujeres no gestantes, DAWKINS y col.¹⁶ comunicaron que el porcentaje de aislamientos de *C. albicans*, aumentaba a medida que se acentuaban los síntomas.

CUADRO N.º 22

Frecuencia relativa de cada una de las especies

	<i>C. albicans</i> N.º	<i>C. clausenii</i> N.º	<i>C. tropicalis</i> N.º	<i>C. krusei</i> N.º	<i>C. lusitania</i> N.º	<i>T. glabrata</i> N.º	<i>S. cerevisiae</i> N.º	Total N.º	%
Sintomáticas	156	66,1	1	12,5	1	20	2	66,6	—
Asintomáticas	80	33,9	7	87,5	4	80	1	33,3	2
Total	236	100	8	100	5	100	3	100	2

CUADRO N.º 23

Frecuencia de cada una de las especies aisladas en relación con las muestras obtenidas (según cuadro clínico)

Síntomas	N.º muestras	Especies								
		<i>C. albicans</i> N.º	<i>C. clausenii</i> N.º	<i>C. tropicalis</i> N.º	<i>C. krusei</i> N.º	<i>T. glabrata</i> N.º	<i>Sacchi, cerev.</i> N.º	<i>C. lusitania</i> N.º	<i>S. cerevisiae</i> N.º	<i>T. glabrata</i> N.º
Leucorrea	262	54	20,6	1	0,3	1	0,3	2	0,7	4
Prurito	33	10	30,3	—	—	—	—	—	—	—
Vulvo-vaginitis	99	45	45,4	—	—	—	—	—	—	—
Vulvo-vaginitis con aftas	55	47	85,4	—	—	—	—	—	—	—

4.4.3. Frecuencia en relación con los distintos períodos de la gestación.

En el cuadro n.º 24 se observa que *C. albicans*, *C. clausenii*, *C. tropicalis* y *T. glabrata* se aislaron en los tres trimestres de la gestación, mientras que las restantes especies no tuvieron un aislamiento constante.

En lo referente a *C. albicans*, vemos que el número de aislamientos aumentó desde el primero al tercer trimestre, siendo mayor la oscilación entre el primero y el segundo, que entre éste y el tercero. De la misma opinión es JENNISON,³⁴ el cual también comprobó este mismo tipo de oscilación en el número de aislamientos de *C. albicans* a lo largo de la gestación.

Por lo que se refiere a los aislamientos de *C. clausenii*, *C. tropicalis* y *T. glabrata*, no se encontraron diferencias apreciables de magnitud y frecuencia en relación con los períodos de la gestación.

4.4.4. Frecuencia en relación con la edad.

La distribución de las especies de levaduras aisladas, en cada uno de los seis grupos de mujeres gestantes que se establecieron según la edad, puede verse en el cuadro n.º 25.

Se comprueba que *C. albicans* y *T. glabrata* se aislaron de las mujeres pertenecientes a todos los grupos, mientras que el aislamiento del resto de las especies solamente se realizó en alguno de ellos. Asimismo, puede observarse, que las frecuencias de estas especies más significativas no presentaron diferencias apreciables en relación con la edad. Por lo cual consideramos que no parece existir ningún tipo de relación edad/especie.

4.5. FRECUENCIA EN RELACION CON OTROS PARAMETROS.

4.5.1. Variación estacional.

La variación estacional de las especies de levaduras aisladas a lo largo de los doce meses del año queda reflejada en el cuadro n.º 26.

Se observa que *C. albicans* se aisló a lo largo de los doce meses, mientras que el resto de las especies no se aisló de una manera constante. Si tomamos como referencia a *C. albicans*, vemos que no ofrece una variación estacional clara.

JENNISON³⁴ ya corroboró este hecho, comunicando que *C. albicans* en las mujeres gestantes, al contrario de lo que ocurre en las enfermedades ginecológicas, no experimentó una variación estacional clara. Esto parece confirmar la relativa independencia de la flora levaduriforme vaginal, de las condiciones macro-ambientales.

CUADRO N.º 24
Frecuencia o variación de especies por trimestres

Trimestres	N.º muestras	Especies												
		<i>C. albicans</i>	<i>C. clausenii</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitania</i>	<i>T. glabrata</i>	<i>S. cerevi.</i>	N.º	%	N.º	%	N.º	%
1er. tri.	327	39	11,9	2	0,6	1	0,3	—	2	0,6	6	1,8	1	0,3
2º tri.	483	84	17,3	2	0,4	3	0,6	—	—	—	9	1,8	—	—
3er. tri.	640	113	17,6	4	0,6	1	0,1	3	0,4	—	6	0,9	2	0,3

CUADRO N.º 25

Edad	N.º muestras	Especies												
		<i>C. albicans</i>	<i>C. clausenii</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitania</i>	<i>T. glabrata</i>	<i>S. cerevi.</i>	N.º	%	N.º	%	N.º	%
16-20	85	14	16,4	—	0,5	2	0,3	—	—	—	1	1,1	—	—
21-25	524	88	16,7	3	0,5	2	0,3	1	0,2	—	4	0,7	2	0,3
26-30	393	67	17	2	0,5	2	0,5	—	—	—	3	0,7	—	—
31-35	226	35	15,4	1	0,4	—	—	—	2	0,8	2	0,8	—	—
36-40	157	23	14,6	2	1,2	1	0,6	—	—	—	8	5	1	0,6
41-45	65	9	13,8	—	—	—	—	—	—	3	4,6	—	—	—

CUADRO N.º 26

Meses	N.º muestras	Especies													
		<i>C. albicans</i>	<i>C. clausenii</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitania</i>	<i>T. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Enero	137	16	11,6	1	0,7	—	—	—	—	—	3	2,1	—	—	
Febrero	132	21	15,9	1	0,7	—	—	—	—	—	2	1,5	1	0,7	
Marzo	130	25	19,2	2	1,5	2	1,5	—	—	—	4	3	—	—	
Abril	109	19	17,4	—	—	3	2,7	1	0,9	—	1	0,9	—	—	
Mayo	110	17	15,4	1	0,9	—	—	1	1,1	—	—	2	2,2	—	
Junio	89	9	10,1	1	1,1	—	—	—	—	—	2	2,2	—	—	
Julio	99	16	16,1	—	—	—	—	—	—	—	2	1,7	1	1,0,8	
Agosto	112	18	16	1	0,8	—	—	—	—	—	1	0,7	—	—	
Septiembre	133	26	19,5	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	
Octubre	106	21	19,8	—	—	—	—	—	—	—	1	0,9	—	—	
Noviembre	170	23	13,5	1	0,5	—	—	—	—	—	1	0,5	—	—	
Diciembre	123	25	20,3	—	—	—	—	1	0,8	—	—	3	2,4	—	—

4.6. ESTUDIO ESPECIFICO DE *C. albicans*

Como consecuencia de que la especie *C. albicans* se la considera la más importante desde el punto de vista patogénico, tanto cualitativamente como cuantitativamente, y el hecho de que nosotros, similarmente a otros autores, la hemos aislado en un porcentaje muy elevado, nos ha inclinado, entre otras razones, a la realización de pruebas específicas para el conocimiento y estudio de la misma.

Como sabemos que existen una serie de técnicas utilizadas mundialmente para conseguir un diagnóstico rápido de *C. albicans*, hemos llevado a cabo la realización de las mismas y así poder comparar los resultados de dichas técnicas, con los generales de diagnóstico utilizados en la tipificación del resto de levaduras de nuestro trabajo.

4.6.1. Recuento de colonias de *C. albicans*.

El recuento de colonias de *C. albicans*, fue distinto según que los inóculos procedieran de mujeres gestantes, con o sin manifestaciones clínicas, y sus valores quedan reflejados en el cuadro n.º 27. Puede observarse, que con los inóculos pertenecientes a mujeres gestantes sintomáticas, se obtuvieron crecimientos confluentes con más frecuencia (49,3 %), mientras que con los de las mujeres asintomáticas, predominaron los crecimientos de 1 a 100 colonias (77,5 %).

Estamos de acuerdo con PEETERS y col.,⁴⁵ los cuales comunicaron, en un trabajo publicado en 1972, referente a mujeres gestantes y no gestantes, divididas en dos grupos, según que presentaran, o no, sintomatología, que la magnitud del recuento del número de colonias de *C. albicans*, fue superior en el grupo de mujeres con síntomas.

CUADRO N.º 27

Recuento de colonias de *C. albicans* en relación con la sintomatología.

N.º colonias	SINTOMATICAS		ASINTOMATICAS	
	N.º cepas	%	N.º cepas	%
1-100	50	32	62	77,5
101-500	29	18,5	12	15
501-confluente	77	49,3	6	7,5
TOTAL	156	100	80	100

4.6.2. Técnicas especiales de identificación.

4.6.2.1. Formación de tubos germinales.

La prueba de filamentación rápida o formación de tubos germinales en suero humano, de ternera y de conejo, resultó positiva con todas las cepas de *C. albicans*, siendo negativa con el resto de las especies. En el cuadro n.º 28 puede observarse que el suero de conejo fue el que proporcionó mejores resultados (15,2 %) para la formación de tubos germinales.

ALTERAS y GAVRILESCO,⁴ consideraron que es ésta una prueba específica para el diagnóstico de *C. albicans*. MACKENZIE,³⁹ sin embargo, observó que no sólo las cepas *C. albicans* producían dichos filamentos, sino también otras especies del mismo género y de los géneros *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, aunque dio gran valor a esta prueba para la identificación de *C. albicans*, cuando se realizaba en unión de las bioquímicas. Por consiguiente, nuestros resultados coinciden plenamente con los obtenidos por ALTERAS y GAVRILESCO.⁴

Por lo que se refiere a la efectividad de los distintos sueros utilizados para la formación de tubos germinales, nuestros resultados concuerdan con los de MACKENZIE³⁹ y ALTERAS y GAVRILESCO,⁴ los cuales afirman que es mayor en suero de conejo³⁹ y en suero humano^{4,39} que en suero bovino, (fig. 7).

CUADRO N.º 28
Formación de tubos germinales

	Sueros					
	humano	%	ternera	%	conejo	%
	N.º		N.º		N.º	
Media de células filamentadas en 236 cepas de <i>C. albicans</i> sobre un total de 500 células contadas	32	6,4	22	4,4	76	15,2

4.6.2.2. Producción de clamidosporas.

El 97,8 % de las cepas tipificadas inicialmente como *C. albicans* formaron clamidosporas, mientras que el porcentaje restante no las formó, por lo que éstas se consideraron *C. clausenii* de acuerdo con el criterio de LODDER.³⁷

Independientemente se investigó la formación de clamidosporas con las restantes especies, obteniéndose un resultado negativo.

DAWSON¹⁷ ha obtenido resultados similares a los nuestros, en lo referente a la producción de clamidosporas por parte de las levaduras, (fig. 8).

5. CONCLUSIONES

1. Entre 1.450 mujeres gestantes estudiadas, 449 presentaron síntomas vulvovaginales (30,9 %), siendo la leucorrea la manifestación más frecuente y el prurito y escozor los menos constantes (7,3 %). En total, se lograron 278 aislamientos de levaduras (19,1 %).
2. No se encontraron diferencias apreciables en relación con la paridad.
3. El aislamiento de levaduras es más frecuente en las gestantes sintomáticas (36,9 %), que en las asintomáticas (11,1 %).
4. Dentro de las mujeres gestantes sintomáticas, se obtuvo un elevado número de aislamientos positivos a partir de las que presentaron vulvo-vaginitis con aftas (85,4 por ciento), y mucho menor a partir de las que sólo presentaron leucorrea (24,2 %).
5. El mayor porcentaje de aislamientos positivos lo fue durante el segundo y tercer trimestre de la gestación.
6. No se observó relación entre la presencia de levaduras en vagina y la época del año.
7. El recuento del número de colonias guardó relación con la sintomatología, siendo la magnitud superior en las muestras procedentes de mujeres gestantes sintomáticas, aunque la existencia de una mayor cantidad de flujo en las mismas pueda determinar un aumento en el volumen de la muestra de este grupo con respecto al de las no sintomáticas.
8. Las 278 cepas aisladas correspondieron a las siguientes especies: *Candida albicans*, *C. clausenii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitania*, *Torulopsis glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*. Representaron a *Candida* spp. el 91,3 % de los aislamientos, siendo *C. albicans* la más frecuente (84,8 %); en las gestantes sintomáticas se aisló en el 94 % de los casos y en las asintomáticas en el 71,4 %.
9. *C. albicans* fue la única especie que se aisló de todas las manifestaciones clínicas, siendo su porcentaje superior el correspondiente a la vulvo-vaginitis con aftas (85,4 %).
10. Para la producción de tubos germinales parece más adecuado el suero de conejo, en comparación con el humano y el bovino.

6. RESUMEN

A fin de comprobar la relación entre la gravidez y la incidencia de levaduras en la vagina humana, se han estudiado 1.450 mujeres gestantes, de las cuales 449 (30,9 %) mostraban síntomas vulvo-vaginales, particularmente leucorrea (58,3 %). A partir del flujo, se aislaron levaduras en 278 casos (19,1 %), identificándose las siguientes especies: *Candida albicans*, *C. clausenii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitania*, *Torulopsis glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*, correspondiendo la mayor

frecuencia a *C. albicans* con el 84,8 %. El mayor porcentaje de aislamientos positivos de levaduras, lo fue durante el segundo y tercer trimestre de la gestación. No se comprobó que la paridad, edad de la mujer y época del año, tuvieran influencia en la presentación de levaduras. En cambio sí la hubo respecto a la sintomatología, obteniéndose una mayor frecuencia en las muestras de mujeres con manifestaciones clínicas (36,9 %), particularmente vulvovaginitis con aftas (85,4 %), que en las mujeres sin ellas (11,1 %). Se ha realizado, a la vez, una comprobación del valor de las pruebas de formación de tubos germinales y clamidosporas, para la tipificación de *C. albicans*.

RESUME

On a fait une étude sur 1.450 femmes en état de gestation dont 449 (30,9 %) montraient des symptômes vulve-vaginaux, spécialement de leucorrhée (58,3 %), à fin de vérifier et confirmer la relation entre la gravité et l'incidence de levures dans le vagin humain.

A partir du flux, on isola des levures dans 278 cas (19,1 %) et on a identifié les espèces suivantes: *Candida albicans*, *C. clausenii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitania*, *Torulopsis glabrata*, et *Saccharomyces cerevisiae*, dont la plus fréquente est celle de *C. albicans* (84,8 %). Le plus grand pourcentage d'isolements positifs de levures eut lieu pendant le deuxième et le troisième trimestres de l'état de gestation.

On remarqua pas que l'accouchement, l'âge de la femme et la saison de l'année eussent de l'influence quant à l'apparition de levures. Au contraire, il y eut de l'influence quant à la symptomatologie, et l'on obtint une plus grande fréquence chez les femmes qui avaient des manifestations cliniques (36,9 %), particulièrement de la vulve-vaginite avec des aphtes (85,4 %), que chez celles qui n'en avaient pas (11,1 %). On a vérifié en même temps la valeur des preuves de formation de tubes germinaux et de clamidospores pour la classification de *C. albicans*.

SUMMARY

A study has been carried out on 1,450 pregnant women, 449 (30.9 %) of which showed some vulvar-vaginal symptoms, specially leucorrhœa (58.3 %), in order to check the relation between the gravidity and the incidence of yeasts in human vagina.

Yeasts were isolated from the flux in 278 cases (19.1 %) and the following species were identified: *Candida albicans*, *C. clausenii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitania*, *Torulopsis glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. The most frequently found was *C. albicans* (84.8 %). The highest percentage of positive isolations

checked that giving birth, the age of the woman and the season of the year had any influence for the yeasts to occur. On the contrary, there was some influence with regard to the symptomatology, being more frequent in women having clinical showings (36.9 %), specially vulvar vaginitis with some aphthes (85.4 %), than in women with no clinical showings (11.1 %). We have also checked the value of tests performed to form germinal tubes and clandidospores and so to classify *C. albicans*.

7. AGRADECIMIENTOS.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Benito Aller Gancedo, director de esta tesis, que, además de proporcionarnos el tema del trabajo ha puesto a nuestra disposición su experiencia en el campo de la micología y su capacidad docente.

Así mismo, al profesor Dr. José Ramón del Sol Fernández, cuyas orientaciones científicas nos han servido como pauta para la realización del trabajo.

Igualmente, al profesor Dr. Miguel Cordero del Campillo, cuya generosa ayuda científica, moral y económica nos ha permitido la culminación de este estudio.

Quiero agradecer también la colaboración del profesor Dr. Antonio Martínez Fernández, del Dr. Máximo Fernández Diez, de la Dra. Margarita Rey Fernández y de don Francisco Rojo Vázquez, así como a todos los miembros del Departamento de Patología infecciosa de la Facultad de Veterinaria de León, donde se ha realizado este trabajo.

8. BIBLIOGRÁFIA

1. AGÜERO, O. y FEO, M. (1963). Candidiasis vaginal y embarazo. *Rvta. Obst. Gin., Venezuela*, **23**, 95-117.
2. AINSWORTH, G. C. (1961) *AINSWORTH & BISBY's. Dictionary fo the Fungi*. 5th ed. Butler & Tanner Ltd., Frome and London, England.
3. AJELLO, L., GEORG, L. K., KAPLAN, W. y KAUFMAN, L. (1966). *Laboratory Manual for Medical Mycology*. U. S. Government Printing Office, Washington. 1st reimp. Apdo. E. U.S.A.
4. ALTERAS, I. y GAVRILESCO, M. (1966). Nouvelles méthodes d'identification rapide du *Candida albicans*. *Derm. Vener.*, **11**, 42-47.
5. AMILIBIA, E., ARENZANA, C. M. y HELGUERA, A. C. (1962). Vulvo-vaginitis micótica (su diagnóstico y tratamiento). *Acta Gin.*, **13**, 447-452.
6. APARICIO GARRIDO, J. y PEÑA YÁÑEZ, J. (1959). Técnicas para el aislamiento de las monilias. En Coloquio sobre *Las Candidiasis humanas*. Edit. «Iquinosa». Madrid, 65-76.
7. BAKERSPICEL, A. (1954). A preferred method for the routine identification of *Candida*. *J. Inf. Dis.*, **94**, 141-143.
8. BITTENCOURT, J. y CAMARA, A. (1956). Micose vaginal. *Rvta. Ginec. Obst., Río de J.* **50**, 167-196.
9. BONFANTE-GARRIDO, R., BARROETA, S. y MONTILVA, A. de (1969). The vaginal fungi in pregnant women. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **37**, 39-44.
10. BOROWSKI, J., BRYLINSKA, A., BULUK, H. y NARUSZEWICZ, S. (1969). Studies of Mycelial Transformation of *Candida albicans*. Cells in the presence of Human sera. *Polish Med. J.*, **8**, 1191-1196. (traduc. inglesa del original).
11. BÜRGER, H. (1970). Ein vereinfachtes Verfahren zum Nachweis fermentativer Leistungen der hefe. *Mykosen*, **13**, 91-96.
12. CAÑESE, A. (1966). Candidiasis y tricomonirosis en secreciones vaginales. *Rvta. Paraguaya de Microbiol.*, **1**, 8-11.
13. CARTER, B., JONES, C. P., ROSS, R. A. y THOMAS, W. L. (1940). Vulvovaginal mycoses in pregnancy with the relation of symptoms to genera and species of fungi. *Am. J. Obst. Gynec.*, **39**, 213-226.
14. DAFTARY, S. N., DAFTARY, V. G., PURANDARE, B. N. y MASANI, K. M. (1963). Vulvovaginal moniliasis (candidiasis) in pregnancy. *Obst. Gynec.*, **21**, 206-209.
15. DAVIS, B. A. (1969). Vaginal moniliasis in private practice. *Obst. Gynec.*, **34**, 40-45.
16. DAWKINS, S. M., EDWARDS, J. M. B. y RIDDELL, R. W. (1953). Yeast in the vaginal flora, their incidence and importance. *Lancet*, **2**, 1230-1235.
17. DAWSON, C. O. (1962). Identification of *Candida albicans* in primary culture. *Sabouraudia*, **1**, 214-219.
18. DROUHET, E. y MILLE COUTEAU, M. (1954). Sur determination des candidas. *Ann. Inst. Pasteur*, **86**, 602-617.
19. FAHLBERG, W. J., DUKES, C. D. y GUTHRIE, R. K. (1957). Rapid classification of candida (monilia). *Alb. Invest. Dermat.*, **29**, 111-118.
20. FAMEREEL, L., SWINNE-DESGAIN, D. y COTTELLER, C. (1970). Mammites, antibiotiques et levures. *Ann. Méd. Vét.*, **114**, 389-409.
21. FEO, M. (1969). 262 levaduras del hombre aisladas en Caracas, Venezuela. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **39**, 299-303.
22. FLENTÉ, F. DE LA, RICO, L. R. y SORIA, F. (1959). Frecuencia de la moniliasis vaginal. En Coloquio sobre *Las Candidiasis humanas*. Edit. «Iquinosa», Madrid, 209-215.
23. GALINOVIC-WEIGLASS, M. y DROBUJAR, P. (1960). Ucestalost kvasnica u vagini. *Lij. vjes.*, **82**, 961-968.
24. GARNIER, G. (1956). Recherches systematiques des levures sur les muqueuses génitales. *Pièses. Méd.*, **64**, 888-889.
25. GATTI, F. y ACCIARO, G. (1966). Note sur l'étiologie spécifique des candidoses vaginales à Leopoldville. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **46**, 387-395.
26. GIARDINELLI, M. y TINETTI, E. (1968). Le micosi vaginali umane da lieviti asporigeni. *Min. Gin.*, **20**, 709-718.
27. GILLESPIE, H. L., INMON, W. B. y SLATER, V. (1960). Incidence of *Candida* in the vagina during pregnancy. Study utilizing the Pagano-Levine culture medium. *Obst. Gynec.*, **16**, 185-188.
28. GONZÁLEZ-OCHOA, A. y GARCÍA-RAMOS, E. (1963). Frecuencia de monilias y moniliasis en vagina: influencia de la antibioterapia. *Rvta. Inst. Salubr. Enferm. trop. (Méx.)*, **23**, 87-94.
29. GRASSET, J., SENEZE, J. y GAUTHIER, R. (1954). Contribution a l'étude des mycoses vulvo-vaginales. *Bull. Soc. Gynec. Paris*, **6**, 181-185.
30. HABERMAN, S., MENDEL, E. B., HALL, D. K. y RAMSEY, L. (1962). The incidence of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in pregnant women. *Obst. Gynec.*, **20**, 639-644.
31. HALDE, C. y ARAGON, G. T. (1956). The incidence of yeastlike organisms in the lower genital tract of pregnant filipino women. *Am. J. Obst. Gynec.*, **72**, 363-366.
32. HURLEY, R. y MORRIS, E. D. (1964). The pathogenicity of *Candida* species in the human vagina. *J. Obst. Gynaec. Br. Commonw.*, **71**, 692-695.
33. JACKSON, J. L. (1956). The incidence of *Candida* in Obstetrical patients. History, incidence, diagnosis. *Am. J. Obst. Gynec.*, **72**, 648-651.
34. JENNISON, R. F. (1966). *Candida* infections in a maternity hospital. En: *Symposium on Candida infections*. Ed. Winner & Hurley. Edt. E. & S. Livingstone Ltd. Edinburg & London, 102-112.
35. JONES, C. P., CARTER, B., THOMAS, W. L., ROSS, R. A. y CREADICK, R. N. (1947). Mycotic vulvovaginitis and the vaginal fungi. *Am. J. Obst. Gynec.*, **54**, 738-747.
36. KUCHARCZYK, W. (1968). Badania nad mikroflorą dróg rodnych kobiety. I. Czestosc wystepowania flory grzybiczej w narządach rodnych kobiet w stanach fizjologicznych i patologicznych. *Ginek. pol.*, **39**, 23-28.
37. LODDER, J. edit. (1970). *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd ed. North-Holland Publishing Co. Amsterdam-London.
38. LODDER, J. y KREGER, Van RIJ, N. J. W. (1967). *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd printing. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
39. MACKENZIE, D. W. R. (1962). Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Path.*, **15**, 563-565.
40. MAHGOUB, E. S. (1968). The incidence of yeasts, in cases of vaginitis and Children with oral thrush in the Sudan. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **36**, 145-149.
41. MENON, K. y JEHAN, F. (1960). Vaginal candidiasis in obstetrics and gynaecology. *J. Indian Med. Ass.*, **34**, 7-10.
42. MIERZEJEWSKI, W. (1969). Kliniczne i epidemiologiczne aspekty zakazienia grzybiczo pochwy u kibiet w trzecim trymestrze ciąży. *Wiad. Lek.*, **22**, 731-734.
43. NAGESKA, C. N. y ANANTHAKRISHNA, N. C. (1970). Clinical and laboratory study of monilial vaginitis. *Am. J. Obst. Gynaec.*, **107**, 1267-1268.
44. O'BRIEN, J. (1964). Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. *Cand. Med. Ass. J.*, **90**, 1073-1074.

45. PEETERS, F., SNAUWAERT, R., SEGERS, J., Van CUTSEN, J. y AMERY, W. (1972). Observations on candidal vaginitis. Vaginal pH microbiology and cytology. *Am. J. Obst. Gynaec.*, **112**, 81-86.
46. PEÑA YÁÑEZ, J. y APARICIO GARRIDO, J. (1959). Técnicas para la identificación micológica de las monilias. En Coloquio sobre *Las Candidiasis humanas*. Edit. «Iquinosa», Madrid, 77-87.
47. PEREIRO MIGUENS, M. (1960). Hongos levaduriformes de la flora vaginal. Comunicación al IV Congreso Internacional de Patología Clínica. Madrid.
48. PORTER, P. S. y LYLE, J. S. (1966). Yeast vulvovaginitis due to oral contraceptives. *Arch. Derm. (Chicago)*, **93**, 402-403.
49. RICO, L. R., FUENTE, de la F. y SORIA, F. (1959). Patogenicidad de las monilias vaginales. En Coloquio sobre *Las Candidiasis humanas*. Edit. «Iquinosa», Madrid, 217-221.
50. ROLDAN DE CASTRO, F. (1959). Epidemiología de la Candidiasis vulvovaginal. *Rvta. Esp. Obst. Ginec.*, **18**, 265-267.
51. ROBINSON, S. C., NICHOLAS, W. C., LEE, D. T., WANKLIN, J. C. y ZWICKER, B. (1968). The relationship of pregnancy, vaginal candidiasis and glucose metabolism. *Canad. Med. Ass. J.*, **96**, 583-584.
52. SIMONE, L. (1966). Estudio comparativo de los medios de cultivo de las micosis en relación con las micosis genitales. *Acta Ginec.*, **17**, 109-116.
53. SPITZBART, H. (1960). Die Häufigkeit der Vaginalmykosen bei Schwangeren und Wöchnerinnen. *Zbl. Gynäk.*, **82**, 523-528.
54. TAUBERT, H. D. y SMITH, A. G. (1960). The clinical use of Taschdjian's medium in the diagnosis of vulvo vaginal candidiasis. *J. Lab. Clin. Med.*, **55**, 820-828.
55. TIMONEN, S., SALO, O. P., MEYER, B. y HAAPOJA, H. (1966). Vaginal mycosis. *Acta Obst. Gynec. Scand.*, **45**, 232-247.
56. UDEN, N. Van. (1960). The occurrence of *Candida* and other yeasts in the intestinal tracts of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **89**, 59-68.
57. VACCARO, H. y FERRADA, L. U. (1952). Estudio micológico de 550 secreciones vaginales de mujeres no embarazadas. *An. Fac. Med. Montevideo*, **37**, 147-150.
58. WINNER, H. I. y HURLEY, R. (1964). *Candida albicans*. J & A Churchill Ltd. London.
59. YARROW, D. (1969). *Candida steatolytica* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**, 24-28.

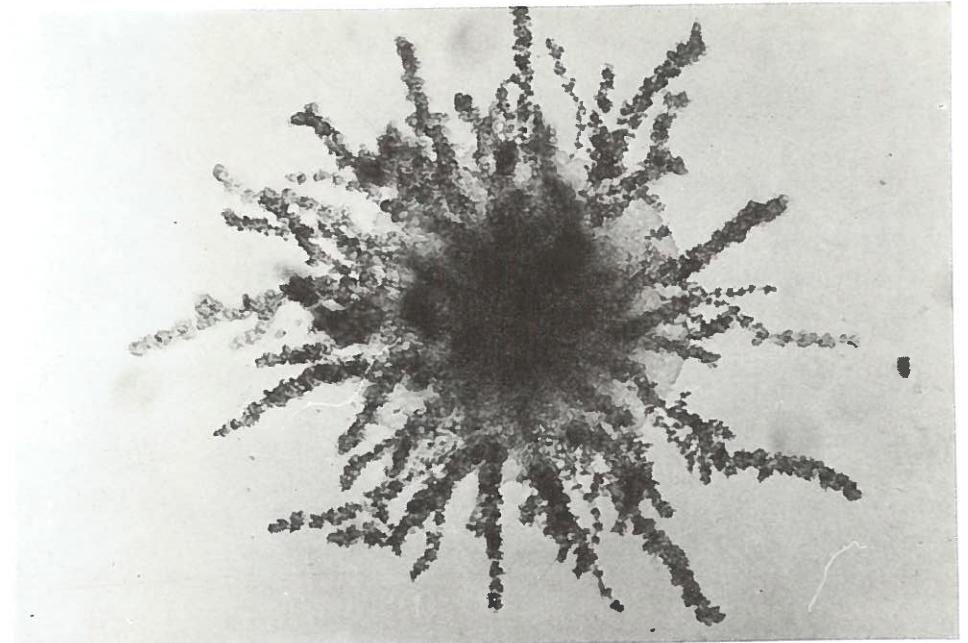


Fig. 1. *Candida tropicalis* (pseudomicelio), 100X.

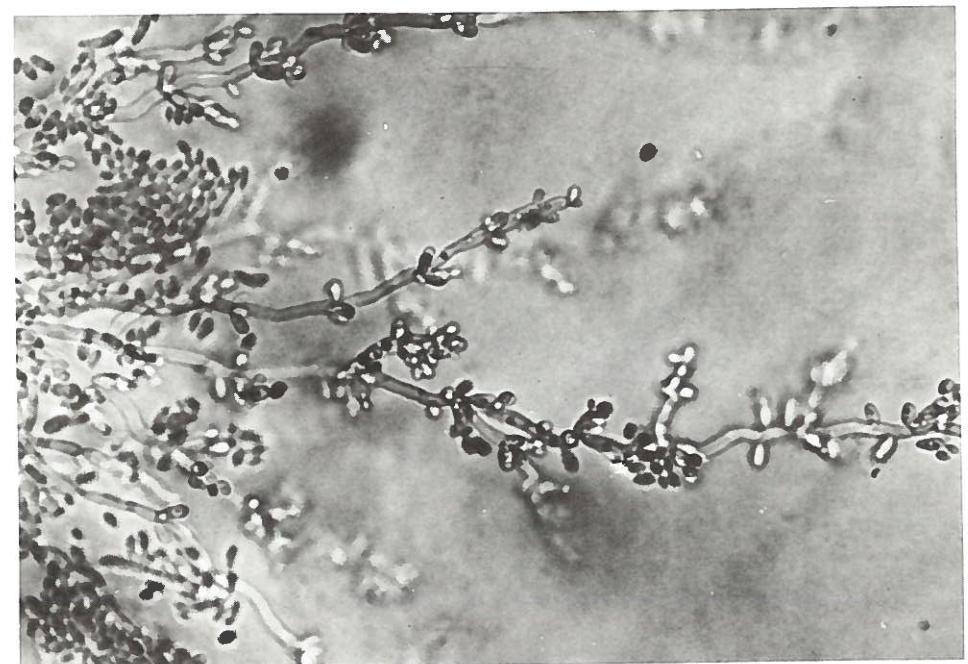


Fig. 2. *Candida tropicalis* (pseudomicelio), 450X.

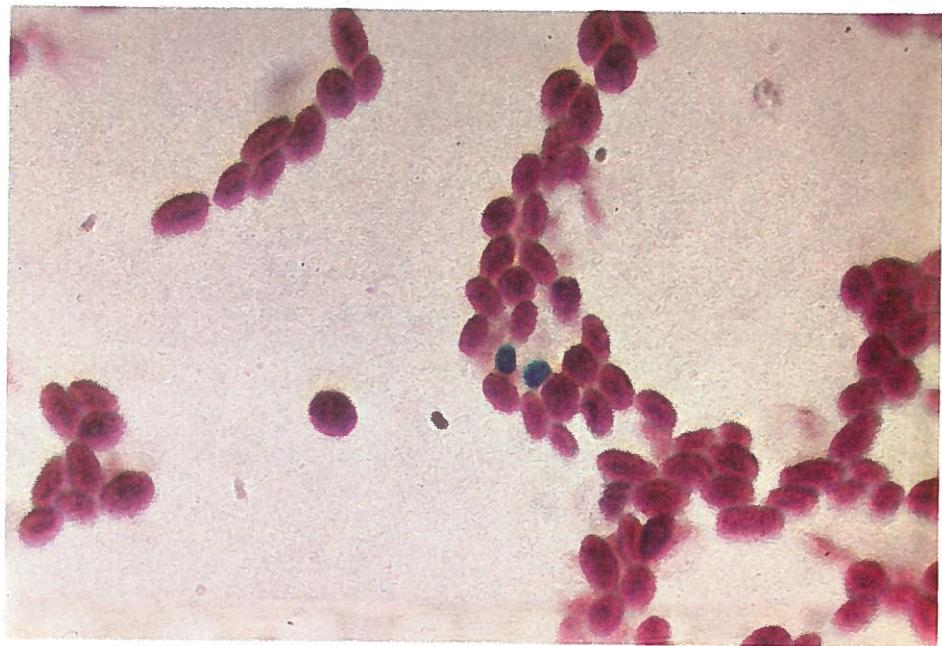


Fig. 3. *Saccharomyces cerevisiae*, (ascospores), 1.000X.

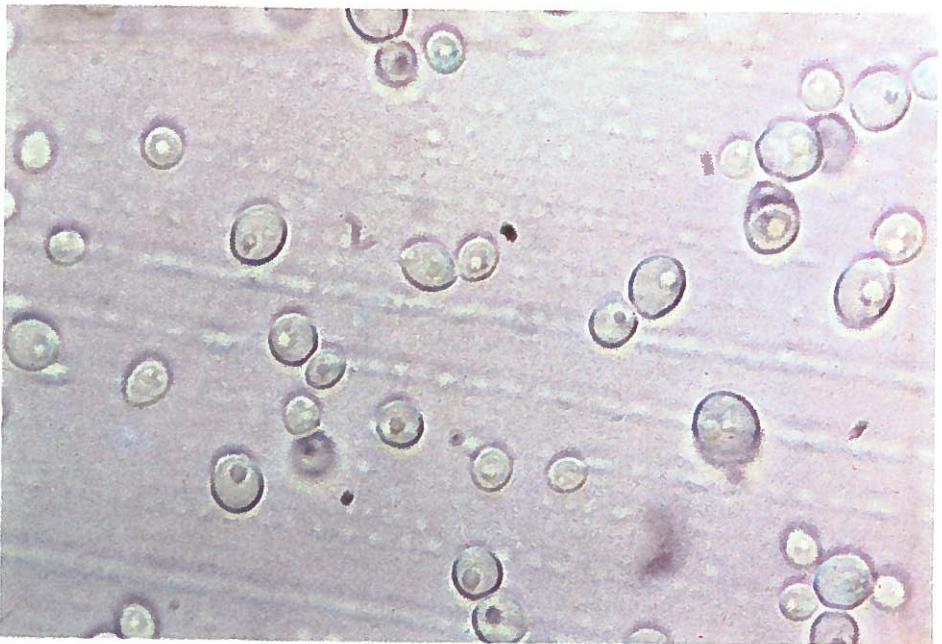


Fig. 4. *Candida albicans*, 1.000X.

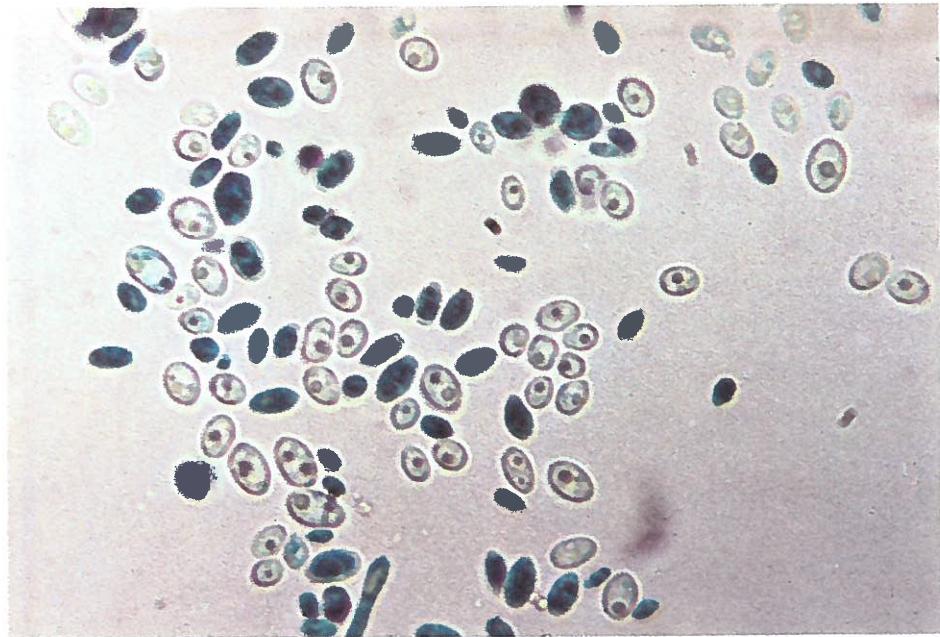


Fig. 5. *Candida tropicalis*, 1.000X.

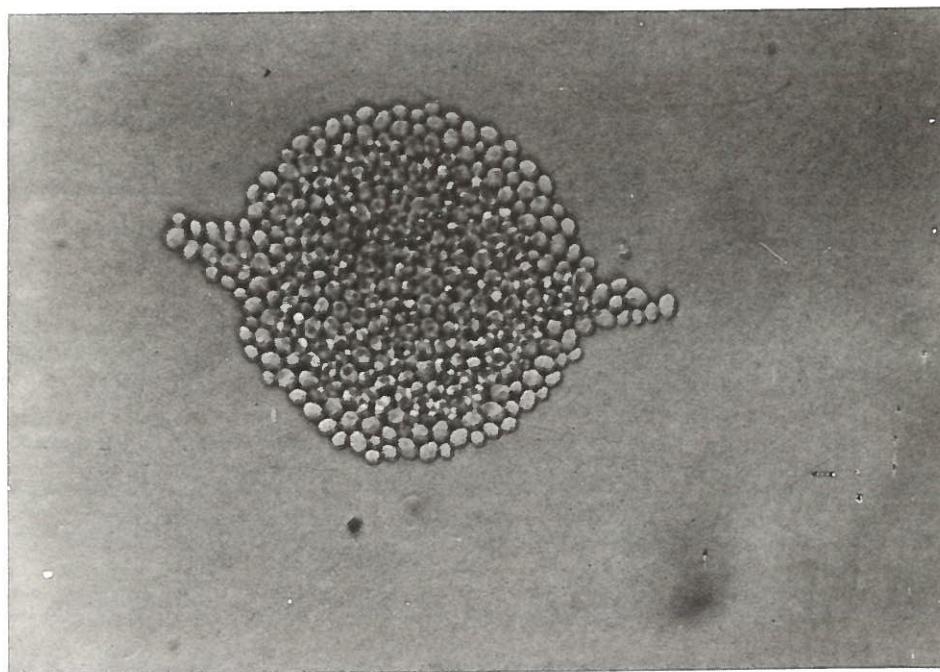


Fig. 6. *Torulopsis glabrata*, 450X.

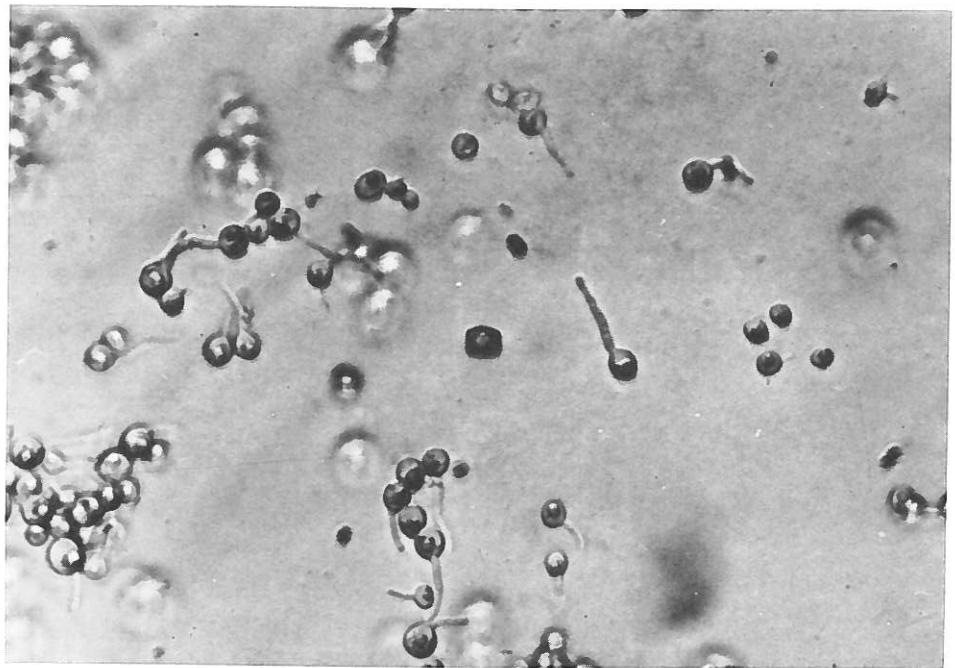


Fig. 7. *Candida albicans*, (tubos germinales), 450X.

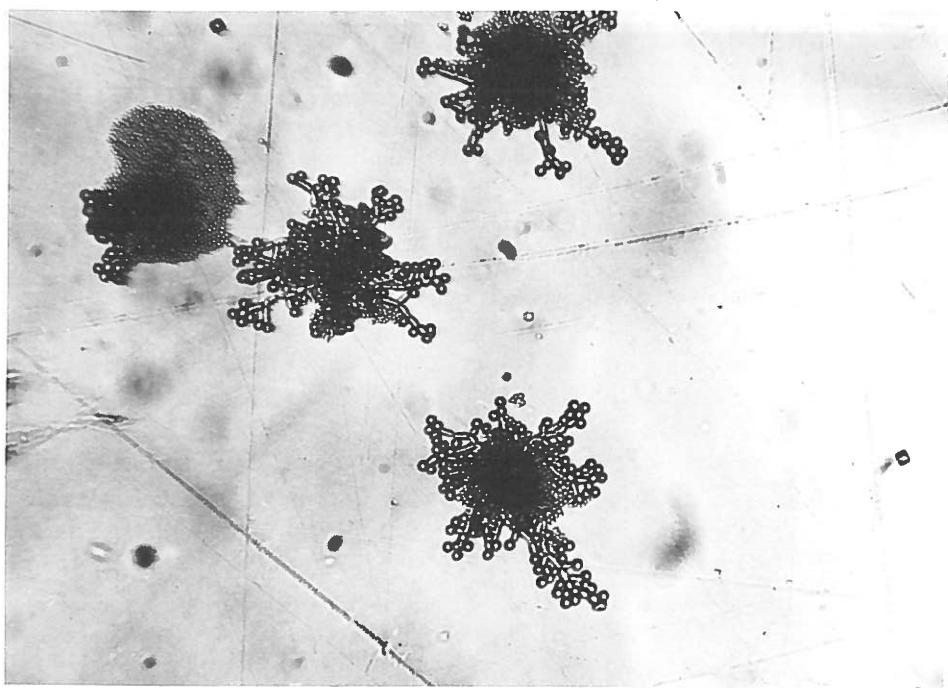


Fig. 8. *Candida albicans*, (cladosporas), 100X.