

59
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE



Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

"EXTRACCION DEL PRINCIPAL ANTIGENO DE PARED CELULAR DE Candida albicans Y PREPARACION DEL SUERO HIPERINMUNE PARA SU DIAGNOSTICO."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ARISDELSY VALDESPINO PIÑUELAS



Director de Tesis: Ph. D. Roberto Arnulfo Cervantes O.

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	29
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

INTRODUCCION

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, reconociéndose más de 250,000 especies entre las cuales de 50 a 100 son patógenas. La patogenicidad de estos microorganismos es de naturaleza multifactorial y las características que deben reunir para ejercer sus efectos patógenos sobre el huésped son los siguientes:

- a) Colonizar las superficies de la piel.
- b) Penetrar a los tejidos del huésped.
- c) Propagación en el ambiente: Isular del huésped.
- d) Resistir o interferir con los mecanismos de defensa del huésped buscando removerlos o destruirlos.

Cuando la introducción es directa dentro de los tejidos del huésped, se manifiesta en patogenicidad. La pérdida de la habilidad de los microorganismos para llevar a cabo cualquiera de estos pasos causan pérdida de la virulencia (54). Los hongos a diferencia de la bacterias presentan dimorfismo o pleuromorfismo cuya manifestación depende de la especie, medio y del estado del huésped. Existen en la naturaleza una variedad de hongos patógenos para el hombre. Los géneros que han recibido mayor atención han sido Cryptococcus, Coccidioides, Blastomyces, Paracoccidioides.

Elastomyces, Histoplasma, Aspergillus y Candida. Para nosotros el género más interesante sin lugar a dudas es el de Candida. La candidosis es una de las enfermedades micóticas más ampliamente distribuidas y prevalentes en el ser humano. La candidosis puede presentarse en varias formas clínicas, estas se pueden dividir en tres categorías: cutánea, mucocutánea, y sistémica. La candidosis cutánea tiene una variedad de formas clínicas que van desde la candidosis congénita, oniquia, paroniquia, genital y la intertriginosa. La candidosis intertriginosa es una enfermedad frecuentemente ocupacional, Existen otros factores que predisponen esta forma de candidosis que son la obesidad y la diabetes. Hacer el diagnóstico de esta micosis es frecuentemente difícil, debido a que las levaduras que pueden estar presentes en la muestra podrían ser infecciones secundarias de la lesión. La identificación del agente etiológico radica en el aislamiento e identificación de su morfología y sus reacciones bioquímicas.

La candidosis mucocutánea es una forma de candidosis de mucosa oral y vaginal siendo los tejidos más frecuentemente involucrados, el diagnóstico se basa en la presencia de levaduras gemando que son ovales. La candidosis mucocutánea crónica es una de las formas de enfermedad más dramáticas y devastadoras. Las víctimas de estas micosis son individuos con una gran variedad de defectos genéticos. Involucra frecuentemente la piel de todo el

cuerpo, uñas, membranas mucosales con hiperqueratinización e inflamación granulomatosa crónica. El diagnóstico se hace con la demostración de células levaduriformes y elementos miceliales en raspados de piel. La candidosis sistémica invade la mayoría de los órganos del cuerpo humano, unos ejemplos de estas infección sistémica es la candidosis pulmonar, endocarditis, fungemia, y nefritis(12,19).

Dentro del género *Candida* se presentan siete especies importantes en medicina las cuales son: *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitana*, *C. stellatoidea* y *C. albicans*, que sin lugar a dudas es la más importantes. Por las características ecológicas, biológica y morfológicas de *Candida albicans*, la hace ser un microorganismo único. *Candida spp* presenta la habilidad de producir pseudohifa en ciertos medios de cultivo, mientras que *Candida albicans* puede presentarse no solo como blastospora y pseudohifa sin como una hifa verdadera (esto cuando se cultiva en suero) y como una clamidospora grande y refringente.

Su potencial patogénico como microorganismo lo hace ser una eucariote medicamente muy importante. *Candida albicans* es una levadura dimórfica patógena para el hombre y animales. Normalmente permanece como comensal en el hombre, aprovechandose de los

desordenes y debilidades del huésped, causando daño en una amplia gama de tejidos. La exposición de los humanos a esta levadura sucede en el momento del parto cuando se atraviesa por el canal vaginal. Dentro de la especie de *Candida albicans*, existen dos serotipos el A y el B clasificados en base a su resistencia a anfotericina B (43). Esta levadura crece en los medios líquidos y sólidos. Se multiplica primariamente por la producción de blastosporas ovoides. El tamaño que presenta la blastospora caracteriza a la especie (43).

Los organelos intracelulares de *Candida albicans* son típicas de las células eucarióticas en general y de levaduras en particular. Se han encontrado en *Candida albicans* ribosomas (3,6,11,40), mitocondrias con una doble membrana típica, vacuolas (6,11) que contienen a veces cuerpos lipídicos y granulos de polifosfato y un nucleo con una doble membrana en los cuales se encuentran las estructuras internas como son los cromosomas. Estudios recientes han revelado la presencia de un poro central en algunas secciones tanto de las hifas a nivel de unión así como en las blastosporas madre e hija. La pared celular así como todas las partes de la célula levaduriformes sufren de cambios metabólicos durante su crecimiento activo y división celular. Esta tiene dos funciones únicas en la célula; mantener la forma de la célula y es el punto de contacto entre la célula y

el medio ambiente.

Estas funciones son de gran importancia en la patogénesis y serodiagnóstico de la candidosis. La pared celular de *Candida albicans* vista al microscopio electrónico muestra una estructura multilaminar (9,13), la cual presenta variaciones dependiendo de la edad y la morfología de la célula. En estudios realizados, los investigadores sugirieron que los cambios son el resultado de las alteraciones que aun no se conocen. Puesto que la pared celular de *Candida albicans* en fase estacionaria es más resistente a las hidrólisis enzimáticas que aquellas células que se encuentran en crecimiento, parece ser que las uniones de los polisacáridos de pared celular se vuelven más cerrados con la edad (7,44).

Existen dos estudios relativos al análisis de la composición de la pared celular de *Candida albicans* (13,26). Aunque existen diferencias en cuanto al análisis empleado siendo en uno muy complicado y sofisticado y el otro sencillo, ambos coinciden en que la pared celular esta compuesta principalmente por polisacáridos siendo las mananas y glucanas y en menor porcentaje quitina, proteínas y lípidos. La presencia de glucosa y manosa en los polisacáridos de *Candida albicans* han sido un hallazgo constante aun en análisis de extractos de pared celular muy complicados (14,26,27,54). Las glucanas y mananas han sido

frecuentemente encontradas combinadas con proteínas en forma de glucoproteína, manoproteína y glucomanoproteínas (28,29). Se han encontrado moléculas química y antigénicamente similares, cuando se han realizado filtrados de cultivos y fracciones solubles en células mecánicamente destruidas de *Candida albicans*, lo cual sugiere que probablemente se originaron en pared (38,40). Por lo cual, se cree que la pared celular de *Candida albicans* contiene una estructura arquitectónica glucoproteica.

De los polisacáridos de pared celular de *Candida albicans* las que han recibido mayor atención por los investigadores han sido las mananas. Las cuales son los componentes polisacáridos que se encuentran en mayor abundancia en la envoltura de la pared celular (48) y son fáciles de extraer (47), de esta manera se pueden obtener como una mezcla de macromoléculas amorfas hidrosolubles. En estudios realizados (4) revelan que la estructura polimórfica de las mananas contribuye con información importante acerca de la especificidad de especie. Las preparaciones de mananas de las levaduras son heterogéneas, con rangos de peso molecular que van de 25,000 a 1,000,000 de daltons (39). El principal carbohidrato de las mananas son la D-manosa, pero sin duda no es el único azúcar involucrado, se han encontrado otros monosacáridos en las mananas los cuales incluyen D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, D-ácido glucurónico, L-arabinosa, L-fucosa

y L-rafínosa (55); todos los investigadores están de acuerdo en que las mananas contienen principalmente enlaces α (1-6) y α (1-2) con residuos de manopiranososa y en menor porcentaje fósforo (5,25,31). Algunos autores han encontrado enlaces poco comunes de α (1-3) entre las unidades de manosa (31). En las revisiones hechas por Phaff (48), se muestra un panorama general de las mananas donde un polisacárido tiene como esqueleto α (1-2) y α (1-3) poco comunes. La diferencia entre los serotipos A y B de *Candida albicans*, está en la cantidad de ramificaciones, la longitud de las cadenas laterales, la posición y proporción de los enlaces α (1-3) (31,48). La conexión que se presenta entre las mananas y las proteínas involucradas es una n-acetilglucosamina como unión entre las mananas y el grupo de la cadena lateral de las proteínas de pared celular (48).

Los polisacáridos de la pared celular de *Candida albicans* son determinantes para cada especie. La estructura química de las mananas a sido estudiada con precisión por lo que las mananas, glucanas, manoproteínas, glucoproteínas y glucomanoproteínas han sido extraídas y etiquetadas para reacciones con anticuerpos con suero contra células completas de *Candida albicans* (26,28,41,57). Los extractos antigénicos de pared celular así como los filtrados de cultivo y los extractos citoplasmáticos, son en general preparaciones crudas que contienen una mezcla de componentes

antigénicamente activos. La especificidad antigénica de las mananas de las levaduras se encuentra en la longitud de las cadenas laterales y en la naturaleza de las hexosas de las cadenas laterales.

Candida albicans como otros microorganismos tienen un impacto muy importante en la inmunidad del huésped (51). La defensa del huésped contra *Candida albicans* involucra tanto la inmunidad celular y la inmunidad humoral así como un mecanismo inmune inespecífico (32). *Candida albicans* tiene la capacidad de inducir efectos inmunomoduladores inespecíficos. Los polisacáridos de *Candida albicans* han sido estudiados *in vitro* por sus efectos de inducción mitogénica (49,50,51). Las mananas afectan la inmunidad celular y la inmunidad humoral así como la fagocitosis de las células inespecíficas (32), las mananas libres pueden bloquear su presentación a los linfocitos por los monocitos (33).

Fischer et al (8,21) fueron los primeros en demostrar que las mananas pueden inhibir la proliferación linfocítica, también inhiben a dosis dependiente mieloperoxidasa (61). Al parecer existen tres receptores en la superficie de los macrófagos que están implicados en la defensa del huésped contra *Candida albicans*, ellos son receptores glucoprotéicos manosil/fucosil, receptor Fc y receptor C3 (33).

Las mananas pueden deprimir la fagocitosis de dos maneras: bloqueando los receptores para que las células levaduriformes no sean opsonizadas y no puedan unirse al receptor o causando una internalización del receptor manosil/fucosil, siendo el segundo al parecer el más probable (20).

Las células levaduriformes completas y los extractos de pared celular activan la cascada del complemento (17,20). La interacción con los componentes del sistema de complemento es un aspecto importante en la patogénesis de *Candida albicans* y es estrictamente dependiente de los componentes del complemento.

Los reportes proveen fuertes evidencias en los cuales se sugiere que la vía alterna del complemento es el mecanismo por el cual las células levaduriformes de *Candida albicans* son opsonizadas (23).

La pared celular de *Candida albicans* es la estructura disponible para la unión de C3 y su activación. C3 se une a *Candida albicans* tanto en sus uniones a hidroxilamina como en las resistentes a hidroxilamina. Previamente se ha demostrado que las uniones sensibles a hidroxilamina son uniones ester probablemente con fragmentos de C3 (22,34,35). Mientras que los enlaces resistentes son debidos probablemente a enlaces amida entre los fragmentos de

C3 (34,35). En la candidosis la ausencia de iC3b sugiere que la activación del complemento no está regulada por los factores H e I (33). Probablemente la activación procede de una manera no restringida hasta que se satura la acumulación de C3 en la superficie de la levadura.

Por lo anteriormente mencionado acerca de los mecanismos de evasión de las células levaduriformes de *Candida albicans* para no ser eliminadas es muy importante conocer lo que sucede con los pacientes que presentan candidosis sistémicas. La inmunosupresión es relativamente común durante el curso severo de alguna infección micótica. Algunos investigadores (1,3), han notado que está presente un factor inhibitorio en suero en pacientes con candidosis mucocutánea crónica el cual suprime las respuestas a los antígenos de *Candida albicans* in vitro e in vivo. Se ha sugerido que este factor inhibitorio en el suero son las mananas, las cuales son los antígenos de superficie en *Candida albicans*.

La candidosis mucocutánea como ya se ha descrito anteriormente es una enfermedad poco común, que se caracteriza por infecciones recurrentes y persistentes de mucosas, uñas y piel por *Candida albicans*. La incidencia de candidosis sistémica ha aumentado alarmantemente (59). Se ha demostrado que las mananas se acumulan en estos pacientes con infecciones activas de *Candida albicans*.

Estas presentan un efecto inhibitorio a la respuesta celular a los antígenos de *Candida albicans* (19,36).

Se ha demostrado que las mananas pueden activar a las células T-supresoras al igual que el resto de los polisacáridos de *Candida albicans* (19,36). La hipótesis que se plantea es que las mananas son la causa principal de las deficiencias inmunes específicas en pacientes con candidosis mucocutánea crónica. Por lo cual, se requiere de una prueba diagnóstica específica y confiable, ya que esta enfermedad permanece como un problema diagnóstico, debido a que no existen signos patognomónicos de esta enfermedad (53,59). Así mismo, los hemocultivos son negativos en gran número de pacientes, aunque existen muchos métodos para diagnosticar los anticuerpos en suero estos carecen de especificidad y confiabilidad para emitir un pronóstico (22).

Las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos anti-candida, deberán ser lo suficientemente sensibles y específicas para diferenciar entre la candidosis sistémica y la presencia de *Candida albicans* en sujetos sanos. Se han realizado muchas pruebas serológicas para determinar anticuerpos en suero las cuales son frecuentemente falso-negativos, porque muchos pacientes con candidosis están inmunocomprometidos y producen pocos anticuerpos (14,38).

Por lo cual, el objetivo de nuestro trabajo fue el de obtener un antígeno que detectara los anticuerpos de pared con una alta sensibilidad y resolución, con este antígeno detectar pequeñas cantidades de anticuerpos de *Candida albicans* con pequeñas muestras de suero. Con la utilización de la doble difusión y las pruebas de precipitación puede esperarse que aumente la calidad del diagnóstico de una candidosis sistémica.

OBJETIVOS

- Obtener la fracción manana de la pared celular de *Candida albicans*
- Purificación de mananas por extracción ácido-alcalina.
- Elaboración de suero hiperinmune para diagnóstico de candidosis

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico.

- a) Cinco conejos de raza Nueva Zelanda.
- b) Cepas de *Candida albicans* serotipo A y B, procedentes de la Micoteca de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Material de Laboratorio

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| a) Tubos de ensaye | s) Matraces Erlenmeyer |
| b) Cajas de Petri | n) Asas de platino |
| c) Balanza analítica y granataria | c) Pipetas |
| d) Mechero | p) Autoclave |
| e) Centrifuga de cámara fría | q) Microscopio compuesto |
| f) Potenciómetro | r) Cámara de Neubauer |
| g) Espectrofotómetro | s) Parrilla eléctrica |
| h) Fermentador | t) Pipeta automática |
| i) Estufa bacteriológica | u) Gradillas |
| j) Refrigerador | v) Vortex |
| k) Vasos de precipitados | w) Bisturí |
| l) Matraces Volumétricos | x) Jeringas |

Reactivos de Laboratorio

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| a) Acido Clorhídrico | t) Metanol |
| b) Sulfato de cobre | u) Butanol |
| c) Hidróxido de sodio | v) Propanol |
| d) Tartrato de sodio y potasio | w) Fenol |
| e) Acido sulfúrico | x) Lugol |
| f) Acido fosfórico | y) Alcohol-acetona |
| g) Acido acético | z) Acetona |
| h) Bicarbonato de sodio | i) Cristal Violeta |
| i) Hidróxido de amonio | ii) Safranina |
| j) Fosfato diácido de potasio | iii) Anilina |
| k) Fosfato ácido de potasio | iv) Negro de amido |
| l) Glucosa | v) Timerosal |
| m) Mancia | vi) Azida de sodio |
| n) Maltosa | vii) Aceite de ricino |
| o) Xilosa | viii) Estreptomicina |
| p) Fructosa | ix) Penicilina |
| q) Rafinosa | x) Cloruro de sodio |
| r) Arabinosa | xi) Reactivo de Folin |
| s) Etanol | xii) Adyuvante completo de Freund |

Medios y Soluciones.

Sabouraud Dextrosa Agar (Biomoni).

- Dextrosa 40.0 g.
- Mezcla de peptonas 10.0 g.
- Agua destilada 1000.0 ml.

El reactivo se disuelve en agua y se pone a hervir durante un minuto para disolver el agar, se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121 C. Posteriormente se adicionan 10 ml. a cada tubo o 40 ml. a cada caja de Petri.

Peptona Biotriptasa al 2% - Dextrosa al 5% (Difco)

- Peptona Biotriptasa 40.0 g.
- Dextrosa 65.0 g.
- Agua destilada 6000.0 ml.

Los ingredientes se disuelven en agua, se colocan dentro de una jarra para 10 litros, se esterilizan en autoclave a 121 C durante 15 min.

Meticilato

- Marca comercial Lilly en una concentración de 1:1000

Solución de Fehling

- Sulfato de cobre pentahidratado 35.0 g.
- Tartrato de sodio y potasio 17.0 g.
- Hidróxido de sodio 50.0 g.
- Agua destilada 3000.0 ml.

Cada ingrediente se disuelve por separado en 1000 ml. de agua destilada. Antes de utilizarse la solución se mezclan los ingredientes y se conservan en un frasco color ambar.

Solución Salina Fisiológica (SSE)

- Cloruro de sodio 0.9 g.
- Agua destilada 100.0 ml.

Los ingredientes se mezclan en un matraz y se esterilizan en una autoclave a 121 C durante 15 min.

Agar Buffer de Boratos

- Buffer de Boratos 100.0 ml.
- Agar purificado (Bioxon) 3.0 g.
- Agua desionizada 100.0 ml.
- Azida de sodio 0.2 g.

El agar se calienta en el agua hasta que se disuelve y el buffer de boratos, se calienta a 56 C en baño maría, se adiciona azida de sodio. La mezcla se vacía en cajas de Petri de 4.5 cm. adicionando 5 ml. Al solidificar el agar se conserva a 4 C hasta su uso.

Buffer de Boratos pH = 8.6

- Acido bórico 7.7 g.
- Tetraborato disodico 13.0 g.
- Agua destilada 500.0 ml.

El agar se calienta a 70 C y los ingredientes se disuelven agitando.

Salina Bufferrada de Fosfatos (PBS)

- Cloruro de sodio. 8.00 g.
- Fosfato Acido de potasio 1.21 g.
- Fosfato diacido de potasio 0.34 g.
- Agua destilada 1000.00 ml.

Se pesan todos los ingredientes y se mezclan en un matraz obteniendo de este manera la solución.

Eluyente para todos los Carbohidratos

- n-Propanol 200.0 ml.
- Agua destilada 50.0 ml.

Se mezclan los reactivos en proporción constante 80/20, antes de utilizarlos como eluyentes.

Revelador Cromatográfico

- Anilina 2 N	18.25 ml.
- n-Butanol	120.00 ml.
- Acido Fosfórico	236.50 ml.

La anilina se mezcla con el n-butanol y se añade el ácido fosfórico en proporción de 1:2 (vol/vol).

Tinción de Polisacáridos

Solución Teñidora

- Negro de Amido	1.0 gr.
- Etanol	250.0 ml.
- Agua destilada	650.0 ml.

Se mezclan los ingredientes y se mantienen en un frasco color ambar a temperatura ambiente.

Solución Desteñidora

- Acido acético	100.0 ml.
- Etanol	250.0 ml.
- Agua destilada	650.0 ml.

Se mezclan los ingredientes y se mantienen a temperatura ambiente.

Métodos de Laboratorio.

Preparación del inóculo pasado

Se sembraron las cepas 7A y 2E de *Candida albicans* por separado, en un medio de SDA. Después de 24 horas de crecimiento las células fueron recolectadas, adicionando 5 ml. del medio de peptona biotriptasa a cada tubo. Para la preparación del inóculo se hicieron diluciones de las células y el número de células se estimó mediante el ajuste con una cámara de Neubauer al microscopio hasta llegar a una concentración de 5×10^8 cel/ml.

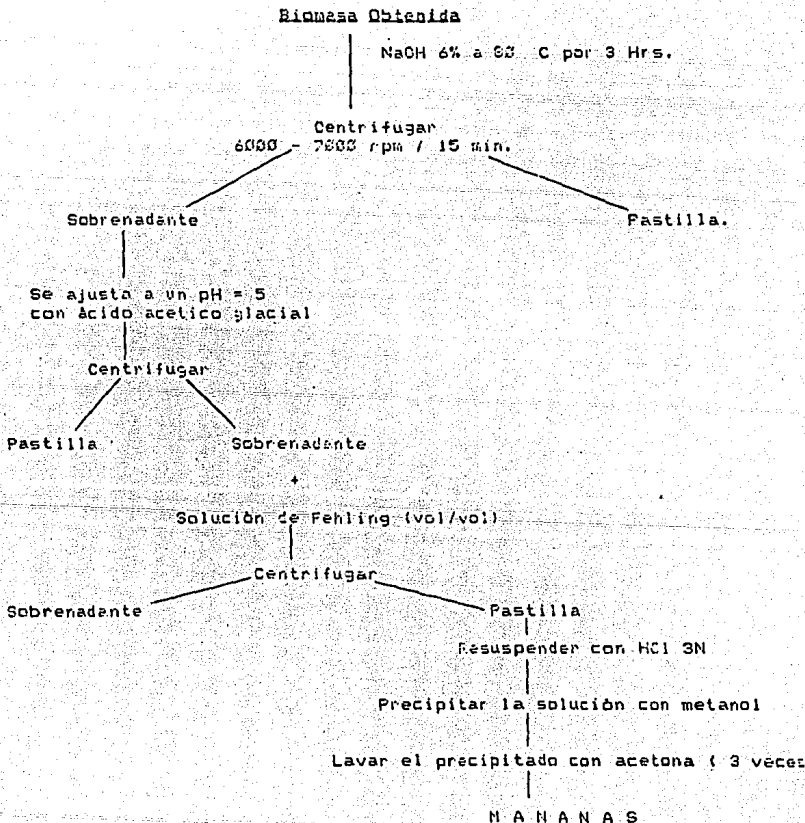
Producción de Biomasa

Para la producción de gran cantidad de biomasa se empleó un fermentador de marca Brunswick. En la jarra o cuba del fermentador se encontraba el medio de peptona biotriptasa-dextrosa previamente esterilizada. Se montó la cuba y se inoculó la cepa deseada adicionando también antibiótico. Se mantuvieron constantes las siguientes condiciones de la fermentación: 100% de saturación de oxígeno, temperatura 37 C, pH = 6.4 y una agitación de 200 - 300 rpm. La fermentación se detuvo a las 24 horas de trabajo.

Inactivación de la Biotina

Después de terminada la fermentación se inactivaron las células utilizando el mercuriato en una concentración de 1:10000. La inactivación fue de aproximadamente 36 horas. Al término de la inactivación se centrifugó el medio, separando así las células.

Método de Extracción



Métodos de identificación

Método de Carbohidratos totales. Fenol-Sulfúrico (18)

Para la realización de la curva patrón, se utilizaron reactivos puros de manosa y glucosa. Se utilizó 0.1 g. de manosa y se llevó a 1000 ml., lo mismo se hizo para la glucosa para obtener de esta manera una concentración de 100.0 g./ml.

0.1 ml. de 1 carbohidrato +	2.4 ml. de agua =	2.5 ml.	10 μ g/ml.
0.2 ml. de 1 carbohidrato +	2.3 ml. de agua =	2.5 ml.	20 μ g/ml.
0.3 ml. de 1 carbohidrato +	2.2 ml. de agua =	2.5 ml.	30 μ g/ml.
0.4 ml. de 1 carbohidrato +	2.1 ml. de agua =	2.5 ml.	40 μ g/ml.
0.5 ml. de 1 carbohidrato +	2.0 ml. de agua =	2.5 ml.	50 μ g/ml.
0.6 ml. de 1 carbohidrato +	1.9 ml. de agua =	2.5 ml.	60 μ g/ml.
0.7 ml. de 1 carbohidrato +	1.8 ml. de agua =	2.5 ml.	70 μ g/ml.
0.8 ml. de 1 carbohidrato +	1.7 ml. de agua =	2.5 ml.	80 μ g/ml.
0.9 ml. de 1 carbohidrato +	1.6 ml. de agua =	2.5 ml.	90 μ g/ml.
1.0 ml. de 1 carbohidrato +	1.5 ml. de agua =	2.5 ml.	100 μ g/ml.

A cada tubo que contenía 2.5 ml., se le adicionó 0.1 ml de fenol al 80%, luego se le agregó 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Se mezclaba enérgicamente y se dejaba reposar durante 30 min. Después de realizado lo anterior, se procedía a hacer las lecturas en un espectrofotómetro a las longitudes de onda para

glucosa 495 nm y manosa 427 nm respectivamente.

El precipitado obtenido después de la extracción era sometido a esta técnica se tomaba una pequeña cantidad de precipitado (si era necesario se hacían diluciones de esta) y se trabajaba como fue mencionado.

Método de Cuantificación de Proteínas. Método de Lowry (37)

La curva patron se realizaba de la manera ya descrita en el método anterior, pero en lugar de utilizar un carbohidrato se utilizó albumina sérica bovina y se le dió las mismas diluciones. Se tomaba 20 μ l. de cada preparación y se le adicionaba 3 ml. de una solución a y b (50 μ l. de a y 1 μ l. de b). Se dejaba reposar durante 10 min., se le adicionaba 0,1 ml. de reactivo de Folin, se agitaba vigorosamente y se dejaba reposar durante 20 min. Las lecturas espectrofotométricas se hacían a la longitud de onda de 750 nm.

A la muestra de las mananás se les trató de la manera ya mencionada. Leyendo a la longitud de onda establecida.

Solución a = Na_2CO_3 al 2% / NaOH 0.1 N

Solución b = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% y Citrato de sodio al 1% (vol/vol)

Método de Cromatografía en Papel

Para la realización de esta técnica se obtuvieron controles de los azúcares que podían estar involucrados en los problemas. Se colocaban los diferentes patrones de los azúcares previamente hidrolizados con HCl concentrado. Las muestras se colocaban en papel Whatman No.1, en la parte alta del papel, se deslizaban sobre la pared de la cubeta que contenía el eluyente (sujeto en la parte alta del recipiente cerrado). A medida que el eluyente se iba desplazando a lo largo del papel, los componentes de la muestra se extendían y separaban por zonas, este proceso tardó aproximadamente 18 hrs.

Los componentes separados se identificaban mediante un revelador. Este se roció sobre las tiras del papel y se llevaban a un horno que tenía una temperatura de 115 C durante 18 min. revelando de esta manera los componentes involucrados.

Las muestras de las mananas también fueron hidrolizadas previamente, se colocaron sobre las tiras de papel Whatman y se dejaron correr los problemas revelando después de 18 hrs. los azúcares involucrados en las mananas.

Métodos Inmunológicos

Concentración de las Mananases

La concentración de las mananases se realizó llenando tubos de diálisis y colocandolos verticalmente en un cuarto frío con un flujo de aire continuo durante 4 días.

Preparación y Estandarización de los Antígenos a Inocular

Para la preparación de los antígenos se sembraron las cepas 7A y 8B de cada *Candida albicans* por separado en tubos de SDA a 37 °C durante 24 hrs. Después de 24 hrs. de crecimiento se procedía a tomar una muestra de cada siembra y se observaron al microscopio para verificar su pureza. Hecho eso, se resuspendían las células en SFF esteril y se inactivaban con mercúrate durante 36 hrs. Al término de la inactivación se realizaron diluciones de las células y se estimó el número de células con la utilización de la cámara de Neubauer al microscopio. Se obtuvo como concentración final 5×10^8 cel/ml para ambas cepas respectivamente.

Protocolo de Inmunización

5 Conejos raza Nueva Zelanda

2 Conejos inoculados
con la cepa 7A

2 Conejos inoculados
con la cepa 8B

1 Conejo como
control negativo

La vía de inmunización:
Intramuscular Profunda

0.5 ml. de adyuvante completo de Freund

1 ml. de células de la cepa a inocular

A los 21 de inmunización se les dió a los conejos una dosis de refuerzo. A los 8 días del refuerzo se tomó una muestra de suero de vena marginal de la oreja y este se enfrentó a las mananías concentradas en una prueba de doble difusión.

Método Serológico

Doble difusión bidimensional (45)

Se fundió el agar en baño maria y se depositó el agar en cajas de Petri como ya se mencionó previamente. El agar contenía un grosor aproximado de 2 - 3 mm. Después de que el agar estaba sólido se

procedió a hacer oradaciones. Se hizo un orificio en el centro de la placa y seis pozos equidistantes a él. Se llenaron los pozos con los antígenos extraídos y el pozo central se llenó con los sueros hiperinmunes extraídos de los conejos. Estas placas entonces se colocaron en una cámara húmeda a 37 C durante 24 hrs. Después del tiempo indicado se podían observar las líneas de precipitación y se realizó el paso de tinción.

Método de Tinción de Polisacáridos (60)

Las placas de doble difusión que presentaron líneas de precipitación fueron lavadas en la solución de PBS durante 30 min. Las placas fueron posteriormente sumergidas en la solución teñidora durante 15 - 30 min. Después de esto se procedió a decolorar con la solución destañadora haciendo lavados de 5 - 10 min., hasta que se eliminara el exceso de colorante.

RESULTADOS

Se efectuaron cuatro fermentaciones, en las cuales se obtuvieron los siguientes resultados de peso seco de biomasa.

OBTENCION DE BIOMASA

Cuadro No. 1

*FERMENTACION	CEPA	VOLUMEN (lit)	BIOMASA (g)
1	7A	5	58.5
2	8B	8	119.5
3	7A	8	150.8
4	8B	8	145.6

CARACTERISTICAS FISICAS DE LAS MANANAS

Las mananas obtenidas en las diferentes extracciones presentaron consistencias diferentes, que iban de cremosas a polvosas. La coloración de ellas era variada, que iba de un color blanco a azul y verde.

METODO DE FENOL-SULFURICO

Cuadro No. 2

CEPA	DENSIDAD OPTICA		CONCENTRACION	
	485 nm	487 nm	Manosa mg	Glucosa mg
7A (N/RT)*	0.845	0.826	9876	912
8B (1a. Ext.)*	1.270	1.252	15201	1400
7A (R. (1))*	1.591	1.616	19751	1769
8B (2a. Ext (2))*	0.654	0.667	7886	692
8B (2a. Ext (1))*	0.249	0.252	27130	2270
7A (R. (2))*	0.705	0.704	83512	7510

(N/RT): No retrabajada

(1a. Ext.): Primera Extracción

(R. (1)): Retrabajada frasco No.1

(2a. Ext (2)): Segunda extracción frasco No.2

(2a. Ext (1)): Segunda extracción frasco No.1

(R. (2)): Retrabajado frasco No. 2

METODO DE LOWRY

Cuadro No. 3

CEPA	DENSIDAD OPTICA 750 nm	CONCENTRACION DE PROTEINAS μg
7A (N/RT)*	- 0.003	0.00
8B (1a. Ext.)*	- 0.045	0.00
7A (R. (1))*	0.007	185.00
8B (2a. Ext (2))*	0.052	358.00
8B (2a. Ext (1))*	0.079	461.92
7A (R. (2))*	0.057	377.30

CROMATOGRAFIA EN PAPEL

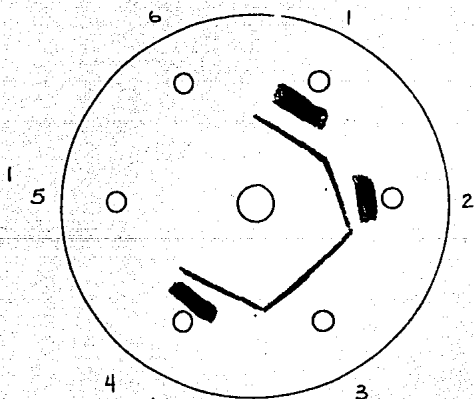
Cuadro No. 4

PROBLEMA	Rf	MANOSA	GLUCOSA
7A (N/RT)*		0.499	0.45
8B (1a. Ext.)*		0.500	0.43
7A (R. (1))*		0.490	0.45
8B (2a. Ext (2))*		0.500	0.44
8B (2a. Ext (1))*		0.489	0.44
7A (R. (2))*		0.490	0.45

IMMUNODIFUSION DOBLE

Figura 1.

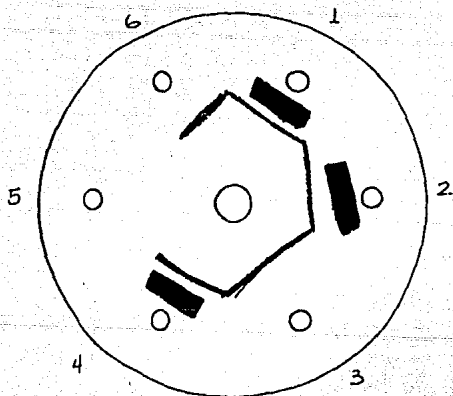
Suero Hiperinmune de la cepa 8B



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elizabeth)

Figura 2.

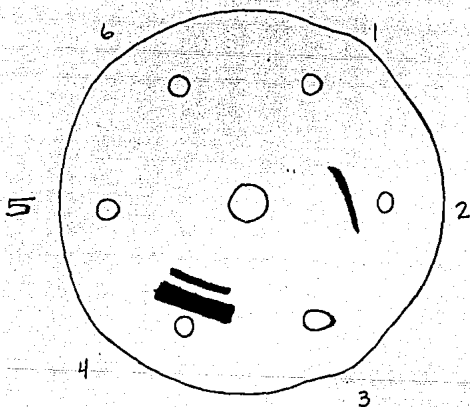
Suero Hiperinmune de la cepa 8B



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elizabeth)

Figura 3.

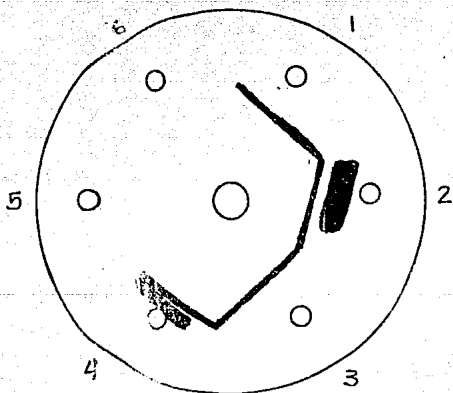
Suero Hiperimmune de la cepa 7A



- 1. Antigeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
- 2. Antigeno de la cepa 7A (R. (1))
- 3. Antigeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
- 4. Antigeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
- 5. Solución salina fisiológica
- 6. Antigeno de la cepa 7A (Elizabeth)

Figura 4.

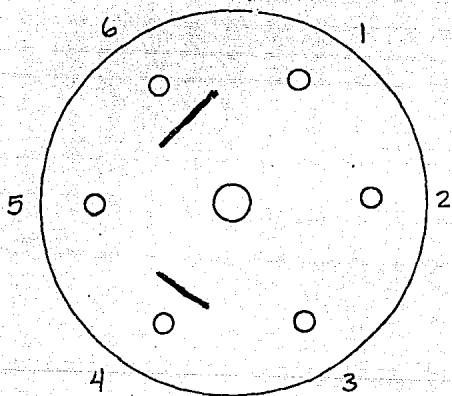
Suero Hiperinmune de la cepa 7A



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elicabeth)

Figura 5.

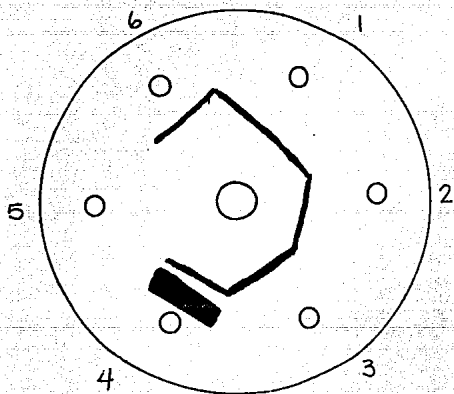
Suero Hiperinmune de la cepa 7A de Elizabeth



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elizabeth)

Figura 6.

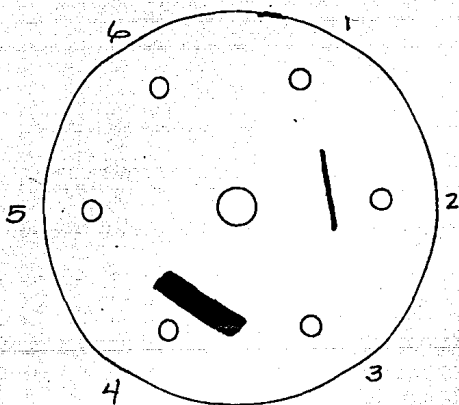
Suero Hiperinmune de la cepa 8B Anti-Candida



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elizabeth)

Figura 7.

Suero Hiperinmune de la cepa 7A Elizabeth



1. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (2))
2. Antígeno de la cepa 7A (R. (1))
3. Antígeno de la cepa 8B (1a. Ext.)
4. Antígeno de la cepa 8B (2a. Ext. (1))
5. Solución salina fisiológica
6. Antígeno de la cepa 7A (Elizabeth)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

Como se puede apreciar en el cuadro No. 1, los biotipos de *Candida albicans* A y B, utilizados en este estudio produjeron cantidades similares de biomasa, en el sistema de fermentación. Produciendo una cantidad de células de 16.1 g/lit. para las cepas 7A y 16.5 g/lit. para la cepa B, esto concuerda con los resultados obtenidos por Reiss et al (5^o), quienes informan una producción de 21.8 g/lit. en una técnica similar. Sin embargo, no es posible efectuar una mayor comparación debido a que no hay autores que reporten su producción de biomasa (28,29).

Sin lugar a dudas, el método de extracción de mananas ma utilizado es el de Peat et al (47). Existen sin embargo una gran cantidad de modificaciones a este, que ofrecen una excelente producción de mananas (4,10,14). El método empleado en el presente trabajo difiere, en que es un método más sencillo, rápido y menos costoso. La principal variación consiste en la cantidad de tratamientos que se efectúan para la extracción siendo en nuestro método solamente dos alcalinizaciones y dos acidificaciones.

Mientras que el método de Peat et al (47), consiste en una serie de alcalinizaciones y acidificaciones además de utilizar reactivos costosos y difíciles de conseguir.

Por lo anteriormente mencionado se observa que es un método que requiere de un mayor tiempo para su desarrollo, así mismo, el número de pasos involucrados aumenta la pérdida de mananas.

Una vez obtenidos los antígenos (mananas), procedimos por otra parte a la determinación de carbohidratos, conocemos por la literatura que las mananas están compuestas principalmente por manosa, con trazas de glucosa y otros carbohidratos (4,24,47,48). Se han reportado que existe manosa y glucosa en proporción 4:1 (24), pero sin embargo, no son los únicos azúcares involucrados (55). Por lo que, se utilizó el método de Fenol-Sulfúrico (18), para conocer los carbohidratos involucrados ya que puede detectar cantidades muy pequeñas de estos. Este método concuerda con el empleado por varios autores, que utilizan esta técnica para la determinación de carbohidratos (22,24,25).

En el cuadro No. 2, se muestran los resultados obtenidos de la prueba, utilizando las muestras de la extracción. Nuestros resultados del método muestran que obtuvimos un promedio de 37.71 mg/ml de mananas para la cepa 8B y 16.73 mg/ml de mananas para la cepa 7A. Mientras que utilizando el método de extracción de Peat et al (47), Gerber et al (24) reportan rendimientos de 9.2 - 10.2 mg/ml de manana, lo cual son cantidades menores a lo obtenido por nosotros.

El cuadro No. 3, muestra los resultados del método de Lowry (37), que nos muestra la presencia de proteínas en la muestra. Nuestros resultados muestran la presencia de pequeñas cantidades de proteína en algunas muestras. Kessler et al (29) y Reiss et al (55) utilizan la microtécnica de Kjeldahl para la determinación de proteínas.

Cifonelli et al (15), reporta que la solución de Fehling inhiben la precipitación de proteínas, lo cual difiere con nuestros resultados ya que si existe la presencia de proteínas, como fue reportado por Kessler et al (29).

El cuadro No. 4, presenta los resultados de la cromatografía en papel (2), que muestra los azúcares involucrados en la muestra. Esta prueba es un método auxiliar utilizado por varios investigadores (29, 62). Ellos reportan la presencia de glucosa y manosa preferencialmente, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestras muestras, utilizando eluyentes y reveladores similares, los cuales son específicos para carbohidratos.

Para la parte inmunológica de este estudio, el protocolo de inmunización para la obtención de suero hiperinmune es muy similar a la empleada por varios autores (24,38,46,52).

Utilizando la prueba de doble difusión (45), el cual es el método de elección por varios investigadores (23,40,55,56,58). En las figuras 1 - 7 se observaron varias bandas de precipitación, unas claras y bien definidas y otras anchas y difusas. Las bandas anchas y difusas son característica de las manañas denominadas bandas H y otras que son claras y bien definidas que son debidas a proteínas, nombradas bandas R (43). Existen varios reportes que confirman la presencia de hasta tres arcos de precipitación en las pruebas de doble difusión (28,55,56,56).

Lo cual indica que nuestros resultados concuerdan con los diferentes investigadores (43,59). Es característica de las manañas, el presentar hasta tres arcos de precipitación por más puras que sean estas, en términos químicos y analíticos (43). Lo cual muestra que la prueba es altamente específica (46) y adecuada con un valor diagnóstico muy importante para la determinación de micosis profundas como la candidosis sistémica.

CONCLUSIONES

1. El sistema de fermentación es el método de elección, para la obtención de biomasa ya que se emplean condiciones óptimas, dando rendimientos importantes.
2. El método de extracción empleado en este estudio es más adecuado que el empleado por Peat et al (47), ya que nos proporciona mayores rendimientos de mananas, evitando grandes pérdidas.
3. La obtención de mananas puras es difícil, ya que se presenta contaminación por la presencia de proteína.
4. El método de Fenol-Sulfúrico (18) es una prueba muy útil ya que puede detectar pequeñas cantidades de carbohidratos, en muestras en las cuales no se puede utilizar grandes cantidades.
5. La prueba serodiagnóstica de la doble difusión demuestra ser un método de elección para la detección de antígenos en el estudio de los sueros hiperinmunes, siendo esta prueba altamente específica.

BIBLIOGRAFIA

1. ARONSON, I.K., C.H. REIGER, K. SOLTANI, V. TRALCEVIC, W.C. CHAN, A.L. LORINEZ, and G. MATZ. 1979. Late onset: Chronic mucocutaneous candidiasis with lymphoma and specific serum inhibitory factor. *Cancer* 43:101-108.
2. AYRES, G. 1970. Analisis químico cuantitativo. Ed. Harla. México.
3. BAKERSPIGEL, A. 1954. Soil-extract agar of *Candida albicans*. *Arch Dermatol Syph* 1169: 735-737.
4. FALLOU, C.E. 1974. *Advances in enzymology*. 40:239.
5. BISHOP, C.T., F. BLANK, and P.E. GARDNER. 1960. The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan and chitin. *Can J Chem* 38:8049-8051.
6. BORGES, M. and S. DENOLLIN. 1974. The preservation of subcellular organelles of *Candida albicans* with conventional fixatives. *J Cell Biol* 62: 574-581.
7. BROWN, J.P. 1971. Susceptibility of the cell wall of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. *Can J Microbiol* 17: 205-208.
8. CARROW, E.W. and J.E. DOMER. 1985. Immunoregulation in experimental murine candidiasis: specific suppression induced by *Candida albicans* cell wall glucoprotein. *Infection and Immunity*. 49:172-181.

9. CASSONE, A., N. SIMONETTI, and V. STRIPPOLI. 1973. Ultrastructural changes in the wall during germ-tube formation from blastospores of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 77:417-424.
10. CASSONE, A., E. MATTIA, and L. BOLDRINI. 1978. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. *J. Gen. Microbiol.* 105:263-273.
11. CAWSON, R. A., and K. C. RAJASSINGHAM. 1972. Ultrastructure features of the invasive phase of *Candida albicans*. *Br. J. Dermatol.* 87:435-443.
12. CHANDLER, F., W. KAPLAN and L. AJELLO. 1980. A colour atlas and textbook of the histopathology of the mycotic disease. Wolfe Medical Publication LTD (Ed). Great Britain.
13. CHATTAWAY, F. W., M. R. HOLMES, and A. J. E. BARLOW. 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 51:367-376.
14. CHATTAWAY, F. M., S. SHENOLIKAR, J. O'REILLY, and A. J. E. BARLOW. 1976. Changes in the cell surface of the dimorphic forms of *Candida albicans* by treatment with hydrolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 96: 335-347.
15. CIFONELLI, J. A., and F. J. SMITH. 1955. The polysaccharide associated with yeast invertase. *J. of Am. Chem. Soc.* 77:31, p. 5492.

16. DeREPENTIGNY, L., and E. REISS. 1984. Current trends of immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. Rev. Infect. Dis. 6:331-339.
17. DIAMOND, F.D., J.E. HAY, M. KANE, M.M. FRANK and J.E. BENNETT. 1973. The role of the late complement pathway in experimental cryptococcosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144:312-315.
18. DUBOIS, M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS, and F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356
19. DURANDY, A., A. FISCHER, F.L.E. DEIST, E. DROUCHET and C. GRICELLY. 1987. Mannan-specific and mannan-induced T-cell suppressive activity in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Journal of Clinical Immunol. 7:488-489.
20. FERRANTE, A.A. FISCHER, and Y.T. YOUNG. 1979. Requirement of heat labile opsonins for maximal phagocytosis of Candida albicans. Fagocytosis. 17:293-297
21. FISCHER, A., J.J. BALLETT, and C. GRICELLI. 1978. Specific inhibition of the in vitro candida-induced lymphocyte proliferation by polysaccharide antigens present in the serum of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Journal of Clinical Investigation 62:1035-1038

22. FISCHER, J.F., R.C. TRINCHER, S.F. AGEL, T.B. BUXTON, C.A. WALKER, D.H. JOHNSON, P.E. CORNIER, N.H. CHEW, J.R. RISSING. 1985. Disseminated candidiasis: a comparison of two immunologic techniques in the diagnosis. Amer. Journal of Medical Sciences. 290:135-142
23. GADD, K.J. and K.B.M. REID. 1981. The binding of complement component C3 to antibody-aggregates after activation of the alternative pathway in human serum. Bioch. J. 195:471-480.
24. GERBER, H., M. HORISBERGER, and H. BAUER. 1973 Immunosorbent for the isolation of specific antibodies against mannan: localization of antigens in yeast cell wall. Infection and Immunity 7:487-492
25. JONES, G.H. and C.E. BALLOW. 1969. Studies of the structure of yeast mannan. II. Mode of action of the Arthro bacter mannoside on yeast mannan. J. Biol. Chem 244:1052-1059
26. JONSEN, J. 1955. Serological studies in fungi. Comparison of agglutinins and precipitins in anti-Candida serum. Acta Pathol. Microbiol. Scand 37:79-83
27. JONSEN, J., S. RASCH and A. STAND. 1955 Specific polysaccharides in the genus Candida. I. precipitation and properties of water soluble fractions. Acta Pathol. Microbiol. Scand 38:79-83
28. KEMP, G. and M. SOLOTOROVSKY. 1964. Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of Candida and Torulopsis. J. Immunol. 93:305-314.

29. KESSLER, G. and W.J. NICKERSON. 1959. Glucomannan-protein complexes from cell wall of yeast. *J. Biol. Chem.* 234:2281-2285.
30. KIRKPATRICK, CH., R.R. RICH and J.E. BENNETT. 1971. Chronic mucocutaneous candidiasis: Model building in the cellular immunity. *Ann. Intern. Med.* 75:955-978.
31. KOCOURREK, J. and C.E. DALLOU. 1969. Method for fingerprinting yeast cell wall mannan. *J. Bacteriol.* 100:955-978.
32. KOLOTILA, M., P. ALVIN, L. ROGERS, E.S. BENEKE and C.W. SMITH. 1967. The effect of soluble *Saccharomyces cerevisiae* mannan on the phagocytosis of *Candida albicans* by mouse-peritoneal macrophages in vitro. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 25:85-95.
33. KOZEL, T. R., BROWN, and G.S.T. PFROMMER. 1967. Activation and binding of C3 by *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 55:1890-1894.
34. LAW, S.K. and R.P. LEVINE. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:2701:2705.
35. LAW, S.K., N.A. LICHTENBERG and R.P. LEVINE. 1979. Evidence of an ester linkage between the site of C3 and the receptive surface. *J. Immunol.* 123:1388-1394.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

36. LOMBARDI, G., D. VISMARA, D. PICOLELLA, V. COLLIZI, G. L. ASCHERSON.
1985. A non specific inhibitor produced by *Candida albicans*
activated T-cell impair cell proliferation by inhibiting
interleukin I. production. *Clin. Exp. Immunol* 60:303-310.

37. LOWRY, O. H., N. Y. ROSENBROUGH, A. L. FARR, and R. I. RANDALL. 1951.
Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal of
Biol. Chem.* 193:265-275.

38. MANNING-ZWEERINK, M. C., S. MALONEY, T. G. MITCHELL, and H. WESTON.
1986. Immunoblot analyses of *Candida albicans*-associated
antigens and antibodies in human sera. *Journal of Clinical
Microbiology* 23:46-52.

39. MASLER, L. S., K. D. SIKL, S. BAJER, and J. GANDULA. 1966.
Extracellular polysaccharide-protein complexes produced by
selected strains of *Candida albicans*. *Eolia. Microbiol.*
11:373-378.

40. MILLER, S. E., B. O. SPUKLOCK and G. E. MICHAELS. 1974. Electron
microscopy of young *Candida albicans* chlamydozoospores.
J. Bacteriol. 119:992-999.

41. ODDS, F. C. and J. C. HIERHOZLER. 1973. Purification and
properties of a glucoprotein-acid phosphatase from *Candida
albicans*. *J. Bacteriol.* 11:257-266.

42. ODDS, F. C., E. G. V. EVANS, and K. T. HOLLAND. 1975. Detection of
Candida precipitins: a comparison of double diffusion and
counterimmunoelectrophoresis. *Journal of Immunol. Methods.*
7:211-218.

43. ODDS, F.C. 1979. *Candida and candidosis*. Leicester University Press (ed). Great Britain.
44. ODDS, F.C., E.G. EVANS, K.T. HOLLAND (in preparation). The ultrastructure of *Candida albicans* in budding and filamentous modes of growth.
45. OUCHTERNOLY, O. 1958. Diffusion-gel methods for immunological analyses. In progress. P. Basel (ed) *Im. allergy*. 5:1-78.
46. PARSONS, E.R. and E. NASSAU. 1974. *Candida* serology in open heart surgery. *J. Med. Microbiol.* 7:415-426.
47. PEATS, S., W.J. WHELLAN, and T.E. EDWARDS. 1961. Polysaccharides of baker's yeast IV. Mannan. *Journal of chemistry Society*. 29-34.
48. PHAFF, H.J. 1971. Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope. In A.R. Rose and J.S. Harrison. (ed) *The yeasts* 2:155-210.
49. PICOLELLA, E., G. LOMBARDI, and R. MORRELLI. 1980. Human lymphocyte properties of a purified polysaccharide from *Candida albicans*: B and T cell cooperation in the mitogenic response. *J. Immunol.* 125:2082-2088.
50. PICOLELLA, E., G. LOMBARDY, and R. MORELLI. 1981. Generation of suppressor cells in the response of human lymphocytes to a polysaccharide from *Candida albicans*. *J. Immunol.* 126:2151-2155.

51. PIERFRANCESCO, M., L. SCARING, L. TISSI, M. BOCCANERA, F. BISTORI, E. BONMASCIER, and A. CASSONE. 1985. Induction of natural killer cell activity by inactivated *Candida albicans* in mice. *Infection and Immunity*. 50:297-303.
52. PONTON, J. and J.M. JONES. 1986. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. *Infection and Immunity*. 53:565-572.
53. GUIDOS, G., J. PONTON, R. CISTERNA. 1987. Detection of antibodies of *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:142-146.
54. REED, W.F., and R.C. WILLIAMS. 1978. Bacterial adherence first step in the pathogenesis of certain infections. *J. Chronic Disease*. 31:67-72.
55. REISS, E., H. STONE, and H.F. HASENCLEVER. 1974. Serological and cellular immune activity of peptidoglycomannan fractions of *Candida albicans* cell wall. *Infection and Immunity*. 9:861-890.
56. STANLEY, C.V., R. HURLEY, and C.J. CARROL. 1972. Distribution and significance of *Candida* precipitins in sera from pregnant women. *J. Med. Microbiol.* 5:313-320.
57. SPENSER, J.F.T., P.A.J. GORIN. 1973. *Biotechnology and bioengineering*. 15:1

58. TASCHDJIAN, C.L., P.J.OKAS, A.CAROLINE, and M.HALLE. 1967. Serodiagnosis of systemic candidiasis. *Journal of Pediatrics* 6:180-187.
59. TASCHDJIAN, C.L., M.S.KOZINN, P.J.SEELING. 1973. Serological diagnosis of candidiasis *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* 4:19-59.
60. WIER, D.M. (ED). 1973. Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific Publication. 1135-1157.
61. WRIGHT, C.D., J.U.BOWRE, and R.D.NELSON. 1984. Influence of yeast mannan on release of myeloperoxidase by human neutrophils: determination of structural features of mannan required for formation of myeloperoxidase-mannan neutrophils complex. *Infection and Immunity* 43:467-471.
62. YU, R.J., C.T.BISHOP, F.P.COOPER, F.BLANK, and H.F. HASENCLEVER. 1967 Glucans from *Candida albicans* (serotype B) and from *Candida parapsilosis*. *J. Biol.* 45:2264-2267.