

73
205.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

**Obtención y Caracterización de
Candidina para pruebas
Inmunológicas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

PATRICIA ALEJANDRINA LECHUGA URIBE

MEXICO, D.F.,

1993.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 Y ANTECEDENTES.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
HIPOTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
A. Hongos.....	14
B. Identificación de <u>Candida albicans</u>	14
C. Selección de cepas.....	16
D. Reactivación de la virulencia.....	16
E. Aislamiento de colonias individuales.....	17
F. Obtención de la forma micelial.....	17
G. Obtención de la forma de levadura.....	18
H. Determinación de las fases de crecimiento de ambas formas (levaduriforme y micelial).....	18
I. Obtención del antígeno levaduriforme y micelial..	19
J. Obtención de suero hiperinmune anti- <u>C. albicans</u> ..	21
K. Sensibilización de cobayos.....	22
L. Pruebas inmunológicas.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	29
ANEXO (Reactivos y medios de cultivo).....	34
LISTA DE TABLAS.....	39
LISTA DE FIGURAS.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	53

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La candidosis es el término utilizado para referirse a las infecciones causadas por levaduras del género Candida. Se considera como una micosis causada por un agente oportunista, frecuente y de distribución mundial. Entre las especies comúnmente patógenas están C. albicans y C. tropicalis, sin embargo existen especies menos frecuentes que también pueden causar candidosis en el hombre, como son C. stellatoidea, C. krusei, C. pseudotropicalis y C. lusitaniae (25), además de otras que pueden aislarse en forma esporádica (44).

C. albicans es un hongo que forma parte de la flora habitual del cuerpo humano, es decir, se encuentra como comensal en el hospedero en forma de levadura. Cuando ocurren alteraciones ya sea del estado fisiológico o del estado inmune, las barreras normales contra la infección se rompen y el hongo comienza a formar micelio y a crecer de manera endógena, dando por resultado la enfermedad llamada candidosis (25). Esto es frecuente en padecimientos tales como muget, vaginitis, endocarditis, diabetes y en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), (34,15,18,22).

C. albicans es un hongo dimórfico, capaz de crecer tanto en forma de levadura como de micelio, dependiendo de las condiciones en que sea cultivada in vitro o de las

condiciones que ofrezca el hospedero in vivo. Este dimorfismo correspondería al segundo grupo de Szanislo (47) que comprende levaduras en forma saprobia y presencia de micelio en tejidos parasitados.

La forma de levaduras también llamadas blastoconidios son estructuras ovales de $2.5 \times 5 \mu\text{m}$ que se reproducen por gemación y contienen al igual que un organismo eucariótico, núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas, gránulos de lípidos y vacuola (40). En su forma micelial C. albicans presenta un crecimiento apical (36) con un tubo o filamento compartimentalizado. Cada compartimento contiene un núcleo y está separado por un septo distinto con un poro septal. Los compartimentos de la hifa contienen los mismos organelos que las levaduras (40).

C. albicans también puede crecer como una forma intermedia entre la levadura y el micelio llamada pseudomicelio, en la cual la forma apical de la célula no está normalmente separada de la célula madre, ni cuenta con un poro septal, lo cual la diferencia del micelio verdadero (47).

La morfología macroscópica de C. albicans se presenta a los tres días como colonias cremosas lisas; un mes después las colonias son cremosas, brillantes, céreas, blandas, lisas y ligeramente reticuladas; los cultivos envejecidos dan colonias rugosas y plegadas con espículas (4).

La candidosis ha sido conocida desde hace varios siglos; Hipócrates en su tratado sobre "Epidemias" describe al muguet (placas blancas) en pacientes debilitados (44). En 1835 Véron postuló que era adquirida por los niños durante el paso a través del útero. También describió los primeros casos de candidosis esofágica. Bennett en 1844 y Robin en 1853, indicaron que la debilidad era el preludio más importante de la candidosis. Al comienzo de la década de los 40's de este siglo, se demostró que la candidosis era la más común de las infecciones fúngicas y estadísticamente C. albicans era el agente infectante común de piel, mucosa y vagina, pero rara vez era causa de enfermedad generalizada grave.

Después de 1940, se despertó nuevamente el interés en la candidosis generalizada y en la endocarditis por Candida debido al aumento de esta enfermedad a causa del empleo de antibióticos de amplio espectro, el uso de terapias inmunosupresoras y más recientemente a la aparición del SIDA. En la actualidad se reconoce a C. albicans como uno de los hongos oportunistas encontrados con mayor frecuencia y se le considera como la causa más común de enfermedades fúngicas graves.

Existen cinco estados generales en los cuales el equilibrio entre Candida y el hospedero pueden estar suficientemente alterados para conducir a un estado

patológico (44):

1. Juventud extrema. Durante el proceso normal de colonización por la flora residente, los factores que restringen a Candida pueden no estar presentes lo que lleva a la producción de un cuadro clínico (muquet, eritema por pañal, etc.)

2. Cambio fisiológico. El embarazo, la administración de esteroides y disfunciones endócrinas como diabetes causan una proliferación por Candida.

3. Administración prolongada de antibióticos. Debido a esto se suprime y altera la flora bacteriana que mantiene el control sobre la población de Candida.

4. Debilidad general y constitución inadecuada del paciente. El grado y la severidad de la enfermedad causada por Candida, se correlaciona con la gravedad de la enfermedad principal. Los pacientes con constitución inadecuada incluye a aquellos con varios defectos en su sistema inmune, como son defectos en la función leucocitaria normal y distintas condiciones de inmunodeficiencia como el SIDA.

5. Candidosis yatrógena y por rotura de la barrera que puede provocar amplia variedad de lesiones. Puede haber colonización en relación con catéteres conectados, procedimientos quirúrgicos o por la simple inyección de material en cualquier parte del cuerpo.

La candidosis es la micosis que presenta la mayor variedad de manifestaciones clínicas, que pueden ser desde

muy leves como las infecciones cutáneas, hasta las más severas como septicemia y endocarditis en pacientes inmunodeprimidos. La clasificación clínica de esta enfermedad según Rippon (44) incluyen: Afección mucocutánea (bucal, vaginitis, balanitis, bronquial, pulmonar, mucocutánea crónica), afección cutánea (intergítrica, generalizada, paroniquia, onicomicosis, eritema por pañal, granuloma por Candida), afección generalizada (vías urinarias, endocarditis, meningitis, septicemia, candidemia iatrógena), y enfermedades alérgicas (candidiasis, eccema, asma).

Por otro lado, C.albicans posee un número de atributos tanto celulares como moleculares los cuales le confieren habilidad para causar la infección, estos son llamados determinantes de patogenicidad (18). Entre estos determinantes se encuentra la adherencia de C.albicans a los epitelios del hospedero (3). Su dimorfismo y la producción de toxinas y de enzimas (proteinasas y fosfolipasas) (9).

El mecanismo de patogenicidad sugerido por Ghannoum y Abu-Elteen (18) para la infección por Candida involucra adherencia y multiplicación en las superficies mucosas, con filamentación y formación de tubo germinativo en el caso de Candida albicans. Esto seguido por producción de enzimas, daño en el tejido, penetración y provocación de una respuesta inflamatoria, que puede culminar, ocasionalmente, en colonización sistémica dependiendo del estado

inmunológico del hospedero y de la habilidad microbiana de proliferar y producir la infección.

Otra estructura importante tanto en la morfología de C. albicans como en su patogenicidad es la pared celular. Durante los cambios morfológicos, el hongo sufre modificaciones las cuales son resultado de una expresión preferencial de manoproteínas constitutivas de pared celular (16,7). La estructura de la pared celular de C. albicans esta compuesta por β -glucanas, quitina y manoproteínas principalmente (12). La habilidad de C. albicans para establecer la infección requiere de múltiples componentes como ya se ha descrito, pero la persistencia en el tejido del hospedero involucra primordialmente una propiedad inmunosupresora por parte de unas glicoproteínas de la pared celular, llamadas manoproteínas. Diferentes investigadores han propuesto que las mananas actúan sobre los monocitos o suprimen a los linfocitos T (35). Además, las mananas son uno de los principales antígenos de C. albicans. La caracterización inmuoquímica de estas manoproteínas de diferentes cepas, ha dado como resultado dos serotipos A y B (17). El serotipo A contiene cadenas de manoproteínas más largas que el serotipo B y además, contiene todos los determinantes antigénicos del serotipo B.

Teniendo en consideración la gran diversidad de manifestaciones clínicas de esta micosis, así como el hecho de ser un comensal en el cuerpo humano, el diagnóstico de

esta enfermedad se torna difícil. Por ello, aunado a los exámenes micológicos de rutina como el examen directo y cultivo, se han implementado diversos procedimientos inmunológicos que ayudan al diagnóstico de esta micosis. Por ello, se han estudiado diversos tipos de antígenos que pueden ser utilizados como reactivos de estas pruebas.

La existencia de antígenos manoproteicos específicos de la forma de levadura o de micelio, ha sido estudiada por diversos autores desde hace varios años. Los primeros antígenos presentes en los extractos celulares, fueron demostrados por inmunolectroforesis cruzada usando suero hiperinmune de conejos, inoculados con extractos citoplásmicos. Axelsen en 1973 (2) demostró más de 78 antígenos precipitantes en extractos citoplásmicos asociados con blastoconidios, usando esta técnica, Evans en 1973 (13) y Syverson en 1975 (52), demostraron un limitado número de antígenos presentes en los extractos citoplásmicos de la forma micelial, que no aparecen en la forma de levadura. Mattews en 1988 demostró la inmunodominancia de un antígeno de 47 kDa en pacientes con candidosis, este antígeno se encuentra en ambas fases del hongo (levadura y micelio), el 74 % de los pacientes estudiados produjeron anticuerpos contra este componente (33). En 1989, Casanova (5) identificó cuatro antígenos compuestos de manoproteínas de alto peso molecular (HMWM), específicos de levadura, con pesos moleculares de 650, 500, 340, y 200 kDa; y dos manoproteínas específicas de la forma micelial, de 260 y 180

kDa. Obtuvo un anticuerpo monoclonal contra la manoproteína de 260 kDa. Esta fracción promete ser un antígeno específico de la forma micelial de Candida que facilite el diagnóstico de la candidosis. El mismo Casanova (1991) identificó posteriormente dos antígenos de pared celular de C. albicans de 43 y 47 KD, a partir de tubos germinativos digeridos con zimolasa (6). El primero reacciona fuertemente con concanavalina A y el otro da una menor reactividad.

Sin embargo la composición química de los antígenos utilizados para diagnóstico, aún no esta bien definida y sus concentraciones en las pruebas inmunológicas muestran gran variabilidad (43). Esto es por la gran diversidad de metodologías para la obtención de los antígenos, que dificulta la comparación de resultados y la estandarización de las técnicas de diagnóstico de la candidosis, sobre todo en su forma invasiva.

Como consecuencia de las investigaciones realizadas sobre antígenos de C. albicans, se ha podido observar la gran variabilidad antigénica que existe entre cepas del hongo que se encuentran causando enfermedad, de aquellas en que solo actuá como comensal, e incluso entre las aisladas de diferentes regiones del mundo, (42). Poulain et al demostraron también la diferencia en reactividad inmunológica de cepas mantenidas por largo tiempo en el laboratorio, así como la importancia de la clonación para obtener reproducibilidad en los antígenos.

Otro aspecto que hace relevante el contar con antígenos de C. albicans bien caracterizados, es su aplicación para medir la inmunidad celular en pacientes, mediante la prueba de intradermorreacción que resulta ser una de las pruebas más sensibles para determinar la inmunidad mediada por células, (26,27).

Debido a estas consideraciones, es de fundamental importancia elaborar antígenos a partir del hongo aislado de la región donde se van a utilizar y caracterizar su reactividad biológica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En vista de que en nuestro país se ha ido incrementando la frecuencia de la candidosis, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos y el hecho de que C. albicans se encuentre como comensal en el cuerpo humano dificultando el diagnóstico de la candidosis sistémica, es necesario obtener y caracterizar antígenos a partir de cepas de C.albicans mexicanas que permitan su utilización como herramienta en el diagnóstico inmunológico de esta micosis.

HIPOTESIS

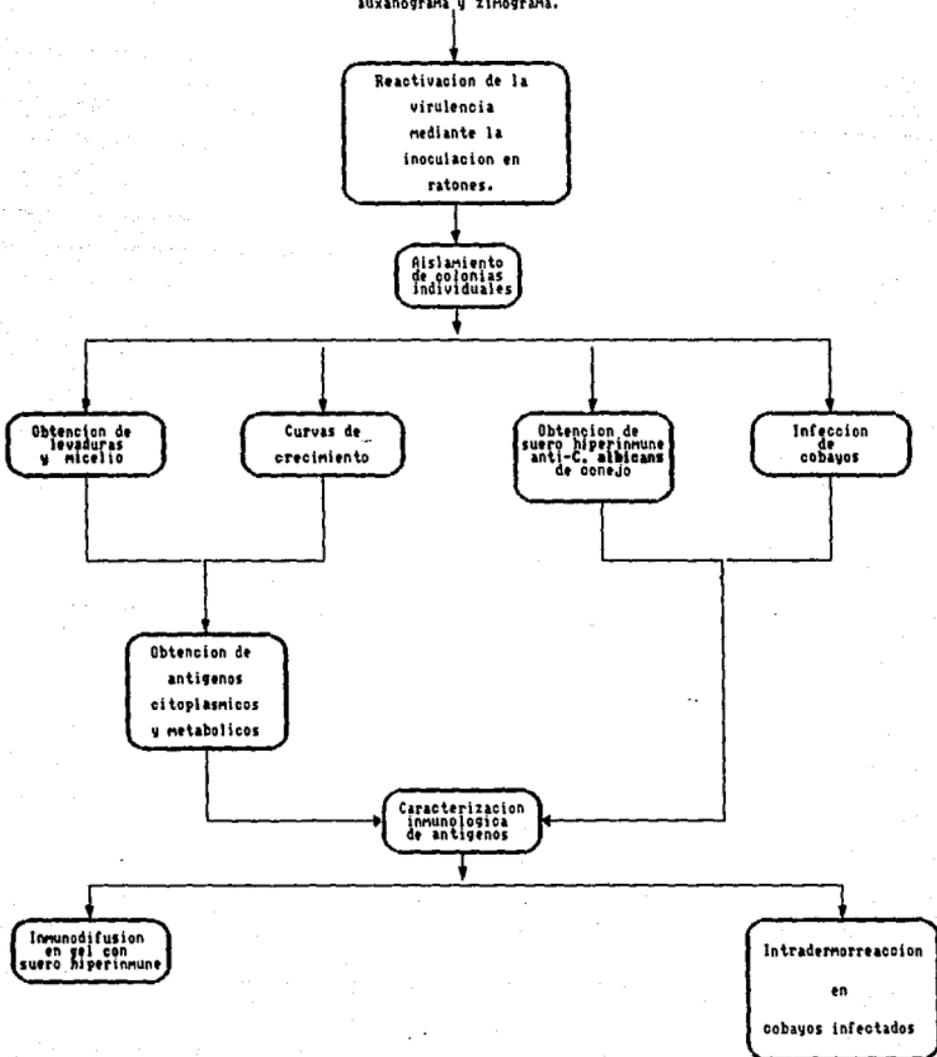
La reactividad inmunológica de Candida albicans presenta variabilidad dependiendo de la cepa, del tipo de antígeno (metabólico ó citoplásmico) y de la forma del hongo.

OBJETIVOS

- 1) Identificar cepas de Candida albicans aisladas de pacientes por medio de pruebas micológicas y bioquímicas.
- 2) Seleccionar las cepas de C. albicans adecuadas para la obtención de antígenos.
- 3) Obtener las condiciones óptimas de cultivo para la fase micelial de C. albicans.
- 4) Determinar las condiciones óptimas para la obtención de antígenos citoplásmicos y metabólicos de levadura y micelio de C. albicans.
- 5) Probar la reactividad inmunológica de los antígenos obtenidos.

DIAGRAMA DE TRABAJO.

Caracterización de cepas de *Candida albicans*.
Formación de tubos germinativos, formación de clamidoconidios,
auxanograma y zimograma.



MATERIAL Y METODOS

A. HONGOS

Se utilizaron las cepas EH-153, EH-154, EH-155, EH-160, EH-161, EH-162, EH-163, EH-164 y EH-165 de Candida sp. aisladas de pacientes con diferentes formas clínicas de candidosis. Estas se mantuvieron en medio de conservación (ver anexo) a 4°C.

B. IDENTIFICACIÓN DE C. albicans

Para identificar a C. albicans de las 9 cepas obtenidas de pacientes se realizaron las siguientes pruebas:

1) Prueba de formación de tubos germinativos.

Todas las cepas se sembraron por estria en medio de agar de Sabouraud (anexo), durante 24 h a 37°C. Se seleccionó una colonia aislada y se transfirió una asada a 1 ml de suero humano y se incubó a 37°C. Transcurridas 2 a 4 h la suspensión se examinó al microscopio, para observar la presencia de tubos germinativos.

2) Prueba para la producción de clamidoconidios.

A partir de un cultivo de 24 h en medio de agar de Sabouraud, de cada cepa se sembraron en profundidad tres líneas paralelas en placas con medio de harina de maíz (Difco) adicionado de Tween 80 al 1%. Los cultivos se incubaron a 28°C de 18 a 48 horas. Después de este tiempo se observó al microscopio la presencia de los clamidoconidios característicos de C. albicans.

3) Auxanograma (asimilación de fuentes de carbono).

Se prepararon suspensiones de cada cepa problema a una concentración igual al tubo No. 4 de la escala de McFarland (aprox. 1.2×10^7 cels/ml) en un ml de agua destilada estéril. Cada suspensión se agregó a un tubo con medio de mantenimiento para auxanograma (anexo) a 45°C, mezclando en vortex. Después de homogeneizar la mezcla se vació en cajas Petri y se dejó enfriar. Se colocaron sobre el agar discos impregnados con los diferentes azúcares: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, inositol, xilosa y dulcitol (anexo). Las cajas se incubaron a 37°C por 48 h y se observó la presencia o ausencia de crecimiento alrededor del disco. Se usaron como controles una cepa de Sacharomyces cerevisiae la cuál asimilaba todos los azúcares y un disco sin azúcar.

4) Zimograma (fermentación de fuentes de carbono).

En esta técnica se utilizó un medio de cultivo líquido con una composición químicamente definida según el método de Wickerham (anexo). Este medio de cultivo se utilizó en tubos con campana de Durham, los cuales contenían individualmente un azúcar diferente. Los azúcares utilizados fueron glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, inositol, xilosa y dulcitol al 5%. Se preparó una serie de tubos para cada cepa. Los tubos se inocularon con 0.2 ml de la suspensión de levaduras cuya concentración era igual al tubo número 4 en la escala de McFarland (aprox 1.2×10^7 cel/ml). Se incubaron los tubos durante 24 h a 37°C. Transcurrido el

tiempo de incubación se observó en cada tubo el crecimiento, formación de gas y viraje del indicador (rojo de fenol) indicando la fermentación del azúcar.

C. SELECCION DE CEPAS

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se seleccionaron las cepas EH-153, EH-154, EH-155, EH-165 y EH-166, correspondientes a C. albicans para el trabajo subsiguiente.

D. REACTIVACION DE LA VIRULENCIA

Las cepas seleccionadas de C. albicans (EH-153, EH-154, EH-155, EH-165, EH-166) fueron inoculadas en ratones para reactivar su virulencia. Se utilizaron dos ratones Taconic machos de 25-30 g de peso por cada cepa. Se inocularon por vía intraperitoneal con la suspensión de levaduras de concentración aproximada a 10^7 cél/ml. Una vez que los ratones fueron inoculados se mantuvieron en observación hasta su muerte. De cada ratón se extrajeron fragmentos de bazo e hígado. Estos fueron sembrados en cajas de Petri con agar de Sabouraud con antibióticos (anexo) e incubados a 37°C por 24 h. Las cepas se reaislaron de los tejidos de cada ratón.

E. AISLAMIENTO DE COLONIAS INDIVIDUALES

Para obtener resultados reproducibles a lo largo del trabajo, se aislaron colonias a partir del crecimiento obtenido de los aislamientos del ratón. De cada aislamiento se sembró por agotamiento en cajas Petri con medio de agar Sabouraud con antibióticos. Las colonias aisladas se transfirieron con palillos estériles a cajas de Petri conteniendo medio de Sabouraud con antibióticos. Las colonias así aisladas se pasaron a medio de conservación (anexo) y se almacenaron a 4°C.

F.OBTENCION DE LA FORMA MICELIAL

De acuerdo a los resultados obtenidos en la infección experimental murina, se seleccionaron las cuatro cepas más virulentas para el ratón.

En tubos con medio de agar extracto de levadura, peptona, glucosa (EPG, anexo) se sembró por duplicado de cada clona de C. albicans (EH-153, EH-154, EH-155 y EH-166) y se incubó a 37°C durante 24 h; después fué centrifugada a 1000 x g. El crecimiento fue resuspendido en 2 ml de solución salina isotónica (SSI) estéril al 0.85%. De esta suspensión se inocularon dos matraces con 20 ml de medio de Lee (29) con glucosa (anexo) por cepa y se incubaron a 37°C por 18 h en agitación. Transcurrido este tiempo las células fueron separadas por centrifugación a 1000 x g por 5 minutos, lavadas dos veces con agua destilada estéril y resuspendidas en 5 ml de agua para ser conservadas a 4°C por 24 h. Se determinó la concentración de células/ml en cámara de

Neubauer y se inocularon 1×10^6 cél/ml por duplicado en matraces de 125 ml conteniendo 20 ml de medio de Lee con n-acetilglucosamina al 0.25% (anexo) por cada cepa. Los matraces se incubaron a 37°C en agitación durante 24 h, observando cada dos horas la morfología microscópica que presentaban las células.

G. OBTENCION DE LA FORMA DE LEVADURA

Para la obtención de la forma de levadura se siguieron los mismos pasos que para la obtención de la forma de micelio cambiando las condiciones de cultivo. Se utilizó medio de Lee con glucosa y la temperatura de incubación fue de 28°C por 24 h.

H. DETERMINACION DE LAS FASES DE CRECIMIENTO DE AMBAS FORMAS (LEVADURIFORME Y MICELIAL)

Todo se realizó como en el experimento anterior variando el medio de cultivo (glucosa para levaduras y n-acetilglucosamina para micelio) y la temperatura de incubación a 28°C y 37°C respectivamente. Cada dos horas se tomaron muestras de 400 μ l. Las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y se guardaron en suspensión con 400 μ l de agua destilada hasta su procesamiento. A cada muestra se le determinó la proteína intracelular por medio del método de Lowry (31) previa hidrólisis de las células con NaOH 0.2 N. Cada curva de crecimiento se realizó por

triplicado. Esta metodología se empleó para ambas formas del hongo.

I. OBTENCION DEL ANTIGENO LEVADURIFORME Y MICELIAL

Con base en los resultados anteriores, se utilizaron las cepas EH-153, EH-154 y EH-155 para obtener los antígenos de la forma levaduriforme y micelial tanto metabólico como citoplásmico, por la facilidad de estas cepas para convertirse en una u otra forma.

Cada cepa se inoculó por duplicado en agar EPG incubándose a 37°C durante 24 h. El crecimiento se suspendió en 2 ml de agua destilada estéril y se transfirió a matraces con 30 ml de medio de Lee con glucosa. Estos fueron incubados 18 h a 37°C para el antígeno micelial y a 28°C para el levaduriforme en agitación. Después de este tiempo, el paquete celular se centrifugó a 1000 x g y se lavó tres veces con agua destilada estéril. Las células se resuspendieron en 5 ml de agua a 4°C por 24 h. Con estas suspensiones se inocularon matraces conteniendo 80 ml de medio de Lee con n-acetilglucosamina (0.25%), a tener una concentración final de células de 1×10^6 cél/ml y se incubaron en baño metabólico en agitación durante 18 h a la temperatura ya indicada para cada forma fúngica. Después de 18 h se inactivaron las células agregando a cada matraz timerosal a una concentración final de 0.02% y se mantuvieron los matraces a temperatura ambiente por 24 h. Se hicieron pruebas de viabilidad en agar de Sabouraud por 24 h

a 37°C. Para el antígeno citoplásmico se separaron las células por centrifugación a 1500 x g por 10 minutos. El paquete celular se congeló a -45°C hasta su procesamiento. Los sobrenadantes de los cultivos fueron destinados a la obtención de los antígenos metabólicos.

Antígeno metabólico.

Los sobrenadantes de los cultivos de cada forma fúngica se filtraron a través de un sistema Millipore y se concentraron a una décima parte de su volumen, utilizando el equipo de ultrafiltración Amicon (Amicon modelo 8400 con membrana PM 10 de 10,000 de P.M). Se envasó en alícuotas y se congeló a -45°C.

Antígeno citoplásmico.

Las células se rompieron según la técnica de Elorza, Marcilla y Sentandreu (12). En un tubo de ensaye de 16 x 150 mm se agregaron 200 mg de células de cada forma fúngica, 5 g de perlas de vidrio de 0.02 mm de diámetro y 2.5 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.2. Se agitó 30 seg en vortex y se enfrió 1 minuto en hielo, se repitieron estos pasos hasta que se observó el 90% de rompimiento celular al microscopio óptico. Se separó el sobrenadante de las perlas de vidrio por decantación y por último, el sobrenadante fue centrifugado a 1500 g por 4 min para separar las estructuras celulares. Se envasó en alícuotas y se congeló a -45°C.

A ambos antígenos se les determinó concentración de proteínas por el método de Lowry (31) y concentración de

carbohidratos por el método de Dubois(10).

J. OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE ANTI-C. albicans

Se preparó una suspensión de células de C. albicans cepa EH-153 a partir de un cultivo de 48 h en agar de Sabouraud con 2 ml de SSI estéril. Se inocularon dos matraces con 80 ml de caldo EPG y se incubaron a 37°C por 48 h en agitación. Después de la incubación se agregó timerosal a una concentración final de 0.02% para inactivar y se agitó 6 h más. Se realizaron pruebas de viabilidad. Las células se separaron por centrifugación a 1000 x g por 10 min, se lavaron tres veces con 10 ml de SSI estéril finalmente fueron resuspendidas en 10 ml de la misma solución, para determinar la concentración de células/ml, en cámara de Neubauer. A partir de estas suspensiones se inocularon por vía endovenosa 2 conejos Nueva Zelanda de 2.5 k de peso siguiendo el esquema que se muestra a continuación (21):

Día	Inóculo (cels/ml)
1	5×10^{-5}
3	5×10^{-5}
5	2×10^{-6}
8	4×10^{-6}
10	8×10^{-6}
12	2×10^{-7}
15	5×10^{-7}

El día 22 se les realizó sangría de prueba para verificar la existencia de anticuerpos en contra de el antígeno aplicado, se considero una reacción positiva en el Ouchterlony cuando el suero diluido 1:4 dio de 3 a más bandas de precipitación bien definidas. Se realizó después sangría de cosecha por punción cardíaca, el suero se separó por centrifugación a 1000 x g, se mezcló para obtener un pool y se almacenó a -45°C.

K. SENSIBILIZACION DE COBAYOS (22)

Para evaluar la reactividad inmunológica en la prueba de intradermorreacción (IDR) de los antígenos, se utilizaron 5 cobayos Hartley de 250-300 g de peso por c/cepa de C. albicans los cuales fueron inoculados intraperitonealmente con 1 ml de una suspensión de 2×10^8 cél/ml (obtenidas mediante la inoculación de levadura en medio de Lee por 24 h a 37°C), en adyuvante incompleto de Freund. Al mes de causada la infección se aplicaron en la región dorsal de los cobayos las intradermorreacciones con los antígenos estudiados.

L. PRUEBAS INMUNOLOGICAS

1) Inmunodifusión en gel (38)

La inmunodifusión se realizó utilizando una solución de glicina pH 7.2 (anexo) con agarosa al 1.0%. En el pozo central se colocó el suero hiperinmune y se dejó difundir 30

minutos. En los pozos laterales se probaron los diferentes antígenos. Se leyó el número de bandas a las 24 y 48 h. Los geles se lavaron con agua destilada durante 24 horas, se secaron y tiñeron con negro de amido.

2) Intradermorreacción (IDR)

Para las pruebas intradérmicas se utilizaron antígenos metabólicos y citoplásmicos de las cepas EH-153, EH-154 y EH-155 tanto de levadura como de micelio. Estos se probaron a una concentración de 10 μ g de proteína en 0.1 ml de SSI estéril. Se aplicó 0.1 ml de antígeno intradérmicamente en el lomo de los cobayos previamente sensibilizados y se leyó la prueba a las 24 y 48 h. La reacción se consideró positiva con un eritema e induración mayor o igual a 5 mm de diámetro. Control 5 cobayos no infectados.

RESULTADOS

Las cepas aisladas de casos clínicos de candidosis fueron las siguientes: EH-153, EH-154, EH-155, EH-160, EH-161, EH-162, EH-163, EH-164 y EH-165. Estas fueron caracterizadas por producción de tubos germinativos, clamidoconidios, auxanograma y zimograma (tabla 1) según las técnicas descritas en material y métodos. En la tabla 1 se puede observar que 6 de las 9 cepas produjeron tubos germinativos. La producción de clamidoconidios se observó en las cepas EH-153, EH-154, EH-155, EH-160, EH-161 y EH-162. La realización del auxanograma y zimograma resultó característico para las cepas EH-153, EH-154, EH-155, EH-160 y EH-161 de *C. albicans* por la asimilación de glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, xilosa y la fermentación con producción de ácido y gas de glucosa y maltosa según Campbell (4) (Tabla 1). Con base en estos resultados se procedió a la reactivación de la virulencia de estas cepas en ratón para su posterior aislamiento. Los resultados de la inoculación en ratones Taconic machos de 25 a 30 g mostraron que 4 de ellas: EH-153, EH-154, EH-155 y EH-161 fueron capaces de producir la muerte murina en dos a tres días, por lo que fueron seleccionadas para los estudios posteriores.

Las cepas se reaislaron del hígado y bazo de cada ratón infectado. Cada una fue sembrada por agotamiento de las colonias aisladas individualmente y se almacenaron en medio de conservación a 4°C.

Las condiciones óptimas de crecimiento para la forma de

levadura, se obtuvieron al cultivar las cepas en medio de Lee con glucosa, durante 18 h a 28°C en agitación, mientras que para la forma micelial, se requirió usar medio de Lee con n-acetilglucosamina a 37°C en agitación por 18 h.

La fase micelial se obtuvo más fácilmente de las cepas EH-153, EH-154 y EH-155 de acuerdo a la metodología mencionada con anterioridad. La cepa EH-161 no formó micelio ni pseudomicelio en ningún momento por lo que fué descartada para el trabajo subsecuente. La secuencia de la transición de levadura a micelio de la cepa EH-155 a diferentes horas de incubación puede observarse en la figura 1. Se observan los clamidoconidios iniciales a las 0 h (1a) inoculados en medio de Lee con n-acetilglucosamina (37°C en agitación). Se observó la producción de tubos germinativos a las 2 horas. Luego a las 4 horas fué posible observar mezcla de levadura y pseudomicelio (Fig. 1b) y a las 8 horas el micelio verdadero era predominante (Fig. 1c). Se obtuvo el 90% de estructuras miceliales a las 12 horas para las cepas EH-153 y EH-154 y a las 18 horas para la cepa EH-155 (Fig. 1d). Después de 20 horas las cepas regresaron totalmente a la fase levaduriforme, mientras que la cepa EH-155 mantuvo una mezcla de micelio, pseudomicelio y levaduras aún después de 24 horas.

Para obtener la fase de crecimiento logarítmico de las tres cepas seleccionadas en las formas de micelio y levadura, se realizaron las curvas de crecimiento, que

pueden observarse en las figuras 2 y 3 respectivamente. Cada curva es el resultado de tres experimentos. El final de la fase logarítmica se obtuvo entre las 18 y 20 h para ambas formas del hongo y para todas las cepas estudiadas, de ahí que los antígenos se obtuvieron en este tiempo de incubación en las condiciones estipuladas en la metodología.

Al antígeno derivado del filtrado del cultivo de ambas formas (levadura y micelio), se le denominó antígeno metabólico de levadura (AgmL) y antígeno metabólico de micelio (AgmM) y el antígeno derivado del rompimiento celular de las dos formas, correspondió al antígeno citoplásmico de levadura (AgcL) y antígeno citoplásmico de micelio (AgcM).

Para determinar la reproducibilidad de los métodos de obtención de los antígenos se obtuvieron 10 lotes de antígenos metabólicos de cada forma fúngica y de cada cepa y 6 lotes de antígenos citoplásmicos para cada forma fúngica de cada cepa, con excepción de la EH-155 en la que se obtuvieron 9 lotes de antígeno citoplásmico de micelio. A los antígenos obtenidos se les determinó su actividad inmunológica mediante las pruebas de intradermorreacción en cobayos infectados e inmunodifusión en gel.

En la tabla 2 podemos observar la concentración de proteínas de los antígenos. Todas las cepas presentan una gran variación entre los valores de los diferentes lotes de antígenos. La tabla 3 corresponde a la concentración de

carbohidratos para las tres cepas y muestra la misma variabilidad en la concentración entre lotes que la mostrada en las proteínas.

La inmunodifusión en gel (Ouchterlony) de los diferentes antígenos con el suero hiperimmune anti-C. albicans EH-153 (tabla 4), mostraron entre 1 y 2 bandas de precipitación para los metabólicos y hasta 3 bandas de precipitación para los citoplásmicos. Los lotes de la cepa EH-155 fueron los que dieron mayor número de bandas, en especial los citoplásmicos tanto en fase de levadura como de micelio. En las figuras 4-7 se pueden observar las bandas de precipitación correspondientes a los diferentes lotes de los antígenos estudiados en la inmunodifusión. En algunos esquemas se pueden observar que algunas de estas bandas gruesas están conformadas por varias delgadas. Las bandas oscuras de mayor longitud corresponden a los antígenos citoplásmicos, ya sea de una u otra fase con algunas raras excepciones. Así como se mostró la variación en concentración de proteínas y carbohidratos en diferentes lotes de la misma cepa, también se encontró esta variación marcada en cuanto a la reactividad serológica entre diferentes lotes de una misma cepa. El mayor número de bandas así como las más gruesas, no correspondieron a la mayor concentración de carbohidratos y proteínas.

En las pruebas de intradermorreacción (Tabla 5) en los cobayos infectados, los antígenos metabólicos y

citoplásmicos dieron una reacción positiva en la mayoría de los lotes. Los resultados son el promedio de tres experimentos. Los antígenos metabólicos y citoplásmicos de levadura y de micelio, presentaron diámetros promedio de induración entre 5 y 11 mm. Los mayores diámetros de induración encontrados, correspondieron a ambos antígenos de la fase de levadura (18 y 19 mm). De los 10 lotes de antígenos de la cepa EH-153, el AgcL del lote 1 y el AgcM del lote 3 no presentaron reactividad. De la cepa EH-154, el AgmL del lote 6 y 8, así como el AgcM del lote 4 tampoco dieron reactividad. Con respecto a la cepa EH-155, todos los antígenos ensayados presentaron reactividad en esta prueba. Los cobayos control mostraron reacción negativa a todos los antígenos estudiados.

Los resultados mostraron que la mayoría de los antígenos obtenidos, poseían reactividad inmunológica tanto en la prueba de inmunodifusión en gel como en la intradermorreacción. La cepa EH-155 mostró la mejor reactividad inmune, tanto en la inmunodifusión en gel como en la intradermorreacción.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Actualmente se considera a Candida albicans como la más virulenta de todas las especies de este género (36). Sin embargo, existen 15 especies del género consideradas como patógenas (18). Este trabajo se realizó con C. albicans aislada de pacientes con candidosis en vías urinarias (EH-155), genitales (EH-154, EH-160, EH-161) y endocarditis (EH-153). A partir de 9 cepas de este hongo, se consideraron solamente tres para la obtención de los antígenos, con base en la producción de tubos germinativos, formación de clamidoconidios, asimilación y fermentación de fuentes de carbono, su mayor virulencia para el ratón y su mayor facilidad de revertirse a la fase micelial. Poulain et al (42) demostraron una asociación entre virulencia y reactividad antigénica en C. albicans y observaron mayor antigenicidad con cepas recién aisladas de pacientes en la prueba de aglutinación, así como mejor reproducibilidad cuando estas fueron clonadas. En otro hongo patógeno, Histoplasma capsulatum, del cual los antígenos derivados de una cepa café proveniente de un paciente con histoplasmosis fulminante, produce los mejores antígenos para pruebas serológicas de diagnóstico (Toriello & Taylor, com. pers.) En este trabajo se observaron los mejores resultados en cuanto a la reactividad inmunológica, con los antígenos derivados de la cepa EH-155 proveniente de un paciente con candidosis en vías urinarias.

En trabajos previos con antígenos de Sporothrix

schenkii (1) y Aspergillus fumigatus (39), se observó que la mayor reactividad inmune correspondía al final de la fase logarítmica de crecimiento de estos hongos. Por lo tanto, los antígenos de este trabajo se obtuvieron de la fase logarítmica de Candida, tanto para la levadura como para el micelio.

Es un hecho controvertido la asociación entre la fase de micelio y la infección producida por este hongo (45), sin embargo, diversos autores afirman una relación causal entre la formación de micelio y la infección (8,30,36,51) y otros asocian la germinación con la invasividad del hongo (3). De acuerdo a Ghanoum & Abu-Elteen (18), ambas formas juntas son importantes en la patogenicidad de esta levadura, ya que mientras el tubo germinativo ayuda a la invasividad, las levaduras son importantes para la multiplicación celular. De las cuatro cepas más virulentas para el ratón la EH-153, EH-154 y EH-155 fueron las que fácilmente mostraron el cambio fenotípico y por lo tanto, se escogieron para la obtención posterior de los antígenos. Durante el proceso de infección, en la candidosis existe lisis de las células fúngicas y por lo tanto, un aumento en la concentración de anticuerpos contra antígenos citoplásmicos. De ahí que diversos autores recomienden el uso de antígeno citoplásmico de la fase micelial como reactivo para las pruebas serológicas de las candidosis sistémicas (25). Apoyan el uso de este tipo de antígeno, diferentes trabajos que muestran la presencia de anticuerpos precipitantes a antígenos de levadura en sueros

humanos normales (2,19,28). Sin embargo, hay fracciones antigénicas inmunodominantes, entre 47 y 59.7 kDa provenientes de antígenos citoplásmicos, que no aparecen en el suero humano normal (20,24,50,).

Por otro lado, los antígenos metabólicos que están constituidos principalmente por componentes solubles de la pared celular, manoproteínas, entre ellos, formando parte de las capas más externas de la pared (17,48), serán los antígenos ideales para medir la respuesta inmune celular por medio de la intradermorreacción (26,27), ya que Candida es un comensal del ser humano. Este tipo de antígeno desencadena una fuerte respuesta en un alto porcentaje de la población normal, siendo entonces la IDR con candidina, un buen parámetro para determinar la respuesta inmune celular en los individuos y que es ampliamente utilizada en pacientes inmunocomprometidos. En este trabajo, tanto los antígenos citoplásmicos como los metabólicos de ambas fases del hongo, demostraron reactividad inmune en las pruebas de IDR en el cobayo, exhibiendo la cepa EH-155 la mejor reactividad.

Debido a la gran variabilidad existente en cuanto a diferentes lotes de antígeno del mismo hongo (23), se obtuvieron 10 lotes de cada antígeno para su análisis. Los resultados concordaron con Huppert (23) ya que mostraron una gran variación en cuanto a concentración de proteínas y carbohidratos de lote a lote. Sin embargo, el 95% de los

antígenos metabólicos y el 100% de los citoplásmicos presentaron reactividad inmune en la inmunodifusión en gel utilizando suero hiperinmune de conejo anti-C. albicans. Cuando se probaron estos antígenos en la prueba de IDR en cobayos infectados el 99% de los metabólicos y el 95% de los citoplásmicos mostraron reactividad inmune en esta prueba. Esto demuestra que la reactividad no puede ser evaluada solamente con base en la concentración de proteínas y carbohidratos, a pesar que diferentes autores concuerdan en el hecho que la fracción de carbohidratos de la molécula antigénica es la responsable de la respuesta inmune humoral y la fracción proteica de la celular (23).

Se han descrito diversos trabajos sobre antígenos de pared celular (12,37,42), citoplásmicos (2,14,22,55), de mananas (12,17,24), metabólicos (12), de tubo germinativo (5,6,12,34,37) y levaduras (5) de Candida albicans. El análisis de la composición de proteínas y glicoproteínas de la pared celular de este hongo ha demostrado una gran variedad compleja de componentes (6), como fracciones específicas de la levadura (8,11,54) o de la pared del tubo germinativo (5,41,51,54). Es hasta fechas recientes que se caracterizó una proteína inmunodominante, de 48 kDa reconocida por sueros de pacientes con candidosis invasiva, reportada como enolasa (enzima glicolítica), presente en ambas formas del hongo y que no reacciona con concanavalina A (32). Sin embargo, estos diferentes estudios implican una tecnología sofisticada y costosa que no está al alcance de

los laboratorios de serodiagnóstico rutinario. Por ello es importante el tener caracterizada una cepa de C albicans, a partir de la cual se pueden obtener antígenos de bajo costo y que sean una herramienta útil, para las pruebas inmunológicas de diagnóstico de la candidosis sistémica.

Como conclusión de este estudio, se recomienda la cepa EH-155 para la producción de los diferentes antígenos, que se utilizan en las pruebas inmunológicas de diagnóstico de la candidosis sistémica y para la prueba de intradermorreacción, para medir la respuesta inmune celular tanto en la población normal como en pacientes inmunocomprometidos. Esta misma cepa ya caracterizada, podrá servir en trabajos futuros para la obtención de sueros hiperinmunes, que sean utilizados en la detección de antígeno circulante en fluidos corporales de pacientes.

ANEXO

MEDIOS Y REACTIVOS UTILIZADOS.

1) Medio de conservación

Este medio de bajo contenido de glucosa fue utilizado para la conservación de las cepas utilizadas.

Glucosa 0.2%

Peptona 1.0%

Agar 1.5%

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

2) Medio de agar de Sabouraud

Peptona 10.0g

Dextrosa 10.0g

Agar 15.0g

Agua destilada 1000ml

pH final 5.6

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

3) Medio de mantenimiento para auxanograma

Reactivo	Cantidad (g/l)
NH_4SO_4	2.0
KHPO_4	1.5
MgSO_4	0.28
Thiamina	10^{-6}
Biotina*	10^{-6}

Acido nicotínico	10^{-6}
Pantotenato de calcio	10^{-6}
Piridoxina	10^{-6}
Agar	20.0
Solución de Berthelot**	1.0 ml

Llevar a 1 l de agua destilada.

Esterilizar en autoclave 15 min a 110°C y 6 lb de presión.

* Esterilizar por filtración.

** Solución de Berthelot:

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	50.0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{Ti}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{GlSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
H_3BO_3	0.05 g
H_2SO_4 concentrado	1.0 ml

Filtrar sobre papel.

4) Discos para auxanograma.

Solución base para impregnar los discos:

Fuente de carbono 3.0 g

Agua destilada estéril 100 ml

Impregnar los discos de papel filtro estériles en la solución de azúcar.

Azúcares utilizados:

Glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, inositol, xilosa y dulcitol.

Los azúcares deben ser esterilizados por filtración.

5) Medio líquido de Wickerham para zimograma.

Fuente de carbono* 5.0g

Base nitrogenada (Difco) 7.5g

Agua destilada 100ml

NaOH 1N 2 ó 3 gotas.

Indicador 1 ó 2 gotas.

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

* Esterilizar por filtración.

Preparación del indicador:

Rojo de fenol 0.01g

Agua destilada 100ml

Azúcares utilizados: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, inositol, xilosa y dulcitol.

6) Medio de agar de Sabouraud con antibióticos.

Peptona 10.0g

Dextrosa 10.0g

Agar 15.0g

Cicloheximida 0.4g

Cloranfenicol 0.05g
Agua destilada 1000ml

pH final 5.6 +/- 0.2

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

7) Medio de agar extracto de levadura, peptona, glucosa (EPG).

Glucosa 1.0%

Extracto de levadura 0.3%

Peptona 0.5%

Agar 1.5%

Disolver en agua destilada

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

8) Medio base de Lee. (29)

K_2HPO_4 2.5g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g

$(NH_4)_2SO_4$ 5.0g

NaCl 5.0g pH 6.8

Prolina 0.05g

Biotina* 5mg

Agregar glucosa al 1.25% para la fase de levadura y
n-acetilglucosamina al 1.25% para la fase de micelio.

Esterilizar a 110°C y 6 lb de presión por 15 min.

* Esterilizar biotina por filtración.

9) Agar para inmunodifusión en gel (Ouchterlony).

Solución salina de glicina pH 7.2

Agarosa	1.0%
Glicina	7.5%
NaCl	0.9% ...
Azida de sodio	0.1%

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Resultado de las pruebas de identificación del género Candida sp. para las nueve cepas estudiadas.

TABLA 2. Concentración de proteínas de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de levadura (L) y micelio (M) de Candida albicans.

TABLA 3. Concentración de carbohidratos de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de levadura (L) y micelio (M) de Candida albicans.

TABLA 4. Inmunodifusión de Ouchterlony con suero hiperinmune anti-C. albicans EH-153.

TABLA 5. Prueba de intradermorreacción con antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de C. albicans.

Tabla 1. Patrones de asimilación (auxanograma) y fermentación (zimoograma) de nueve cepas de *Candida* sp.

Cepas de Tubos ger- <i>Candida</i> minativos	Clasido reñidos	A s i m i l a c i ó n								Fermentación (A/G)								
		glu	mal	sac	lac	gal	ino	xil	dul	glu	mal	sac	lac	gal	ino	xil	dul	
EH-153	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	AG	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-154	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	AG	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-155	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	AG	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-160	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	AG	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-161	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	AG	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-162	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	AG	AG	-/-	A/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-163	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-164	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
EH-165	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	AG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

glu= glucosa, mal= maltosa, sac= sacarosa, lac= lactosa, gal= galactosa, ino= inositol, xil= xilol, dul= dulcitol; A= ácido, G= gas.

Tabla 2
Concentración de proteínas de antígenos metabólicos (Agm)
y citoplásmicos (Agc) de levadura (L) y micelio (M)
de *Candida albicans*

CEPA	LOTE ANTIGENO	CONCENTRACION DE PROTEINAS $\mu\text{g/ml}$			
		AgmL	AgmM	AgcL	AgcM
EH-153	1	185	404	490	460
	2	127	316	506	440
	3	333	537	403	80
	4	241	357	430	40
	5	190	323	450	397
	6	333	504	590	406
	7	369	447	ND	ND
	8	160	739	ND	ND
	9	273	614	ND	ND
	10	ND	674	ND	ND
EH-154	1	290	457	750	607
	2	249	345	421	390
	3	229	435	390	440
	4	229	435	696	486
	5	305	432	1111	492
	6	60	432	ND	653
	7	233	441	ND	603
	8	230	357	ND	ND
	9	520	388	ND	ND
	10	ND	447	ND	ND
EH-155	1	690	491	721	300
	2	288	205	356	831
	3	361	233	500	620
	4	594	323	813	1275
	5	393	260	802	1290
	6	215	382	1324	946
	7	269	732	ND	1135
	8	269	977	ND	400
	9	350	765	ND	1240
	10	253	717	ND	ND

ND= No determinado

Tabla 3

Concentración de carbohidratos de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de levadura (L) y micelio (M) de Candida albicans

CEPA	LOTE	CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS $\mu\text{g/ml}$				
		ANTIGENO	AgmL	AgmM	AgcL	AgcM
EH-153	1		1266	153	3334	1331
	2		735	88	401	566
	3		764	484	717	421
	4		398	121	621	554
	5		178	531	2189	1936
	6		1342	454	454	1474
	7		3561	324	ND	ND
	8		253	601	ND	ND
	9		3052	130	ND	ND
	10		746	ND	ND	ND
EH-154	1		539	212	1015	1421
	2		280	2250	525	1165
	3		684	271	1190	517
	4		802	233	826	854
	5		1426	673	1378	826
	6		746	619	ND	934
	7		601	316	ND	ND
	8		758	546	ND	ND
	9		520	587	ND	ND
	10		608	346	ND	ND
EH-155	1		41	168	1322	470
	2		301	230	458	1362
	3		134	143	1170	1546
	4		178	550	864	1443
	5		107	45	1582	1867
	6		291	36	1922	1314
	7		245	684	ND	1443
	8		3222	839	ND	5181
	9		419	304	ND	1288
	10		278	1344	ND	ND

ND= No determinado

Tabla 4
Inmunodifusión de Ouchterlony con suero
hiperinmune anti-*C. albicans* EH-153

ANTIGENOS	LOTE	NUMERO DE BANDAS CON <i>C. albicans</i>		
	ANTIGENO	EH-153	EH-154	EH-155
Metabólicos de levadura	1	1	2	2
	2	1	2	2
	3	1	1	2
	4	2	2	2
	5	2	-	2
	6	2	2	2
	7	1	2	2
	8	-	2	2
	9	2	2	2
	10	ND	ND	1
Citoplásmicos de levadura	1	3	2	3
	2	3	3	3
	3	2	3	3
	4	3	3	3
	5	3	2	2
	6	3	ND	3
Metabólicos de micelio	1	1	1	1
	2	1	3	2
	3	1	1	2
	4	1	2	1
	5	1	2	1
	6	1	2	1
	7	1	2	1
	8	1	2	1
	9	1	2	-
	10	3	2	1
Citoplásmicos de micelio	1	3	3	3
	2	3	3	3
	3	2	2	3
	4	1	3	3
	5	2	2	3
	6	2	3	3
	7	ND	3	3
	8	ND	ND	2
	9	ND	ND	2

ND= No determinado

Tabla 5
Prueba de intradermorreacción con antígenos
metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc)
de C. albicans

CEPA	LOTE	INTRADERMORREACCION (mm)			
		ANTIGENOS	AgmL	AgmM	AgcL
EH-153	1	11	13	-	9
	2	5	10	5	10
	3	11	7	9	-
	4	18	18	9	7
	5	8	8	11	10
	6	9	12	18	10
	7	6	8	ND	ND
	8	10	12	ND	ND
	9	12	12	ND	ND
	10	ND	11	ND	ND
EH-154	1	15	6	8	8
	2	11	9	8	13
	3	9	9	11	6
	4	8	6	11	3
	5	6	13	11	6
	6	-	9	ND	5
	7	9	12	ND	ND
	8	4	9	ND	ND
	9	15	9	ND	ND
	10	ND	11	ND	ND
EH-155	1	7	10	15	7
	2	13	9	11	9
	3	6	9	12	10
	4	6	11	19	7
	5	11	11	10	7
	6	13	6	11	6
	7	11	13	ND	15
	8	9	15	ND	9
	9	11	11	ND	12
	10	11	6	ND	ND

La reacción se consideró positiva cuando el diámetro promedio de induración fue a 5 mm.
 ND= no determinado. L= Levadura M= Micelio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Secuencia de la transición de levadura a micelio de la cepa EH-155.

FIGURA 2. Curva de crecimiento fase micelial de C. albicans cepas EH-153, EH-154 y EH-155.

FIGURA 3. Curva de crecimiento fase de levadura de C. albicans cepas EH-153, EH-154 y EH-155.

FIGURA 4 y 6. Inmunodifusión de Ouchterlony de un pool de sueros hiperinmunes anti- C. albicans con diferentes lotes de antígenos metabólicos y citoplásmicos de la fase de levadura y micelio de las cepas EH-153 y EH-154 de C. albicans.

FIGURA 5 Y 7. Inmunodifusión de Ouchterlony de un pool de sueros hiperinmunes anti- C. albicans con diferentes lotes de antígenos metabólicos y citoplásmicos de la fase de levadura y micelio de las cepas EH-154 y EH-155 de C. albicans.

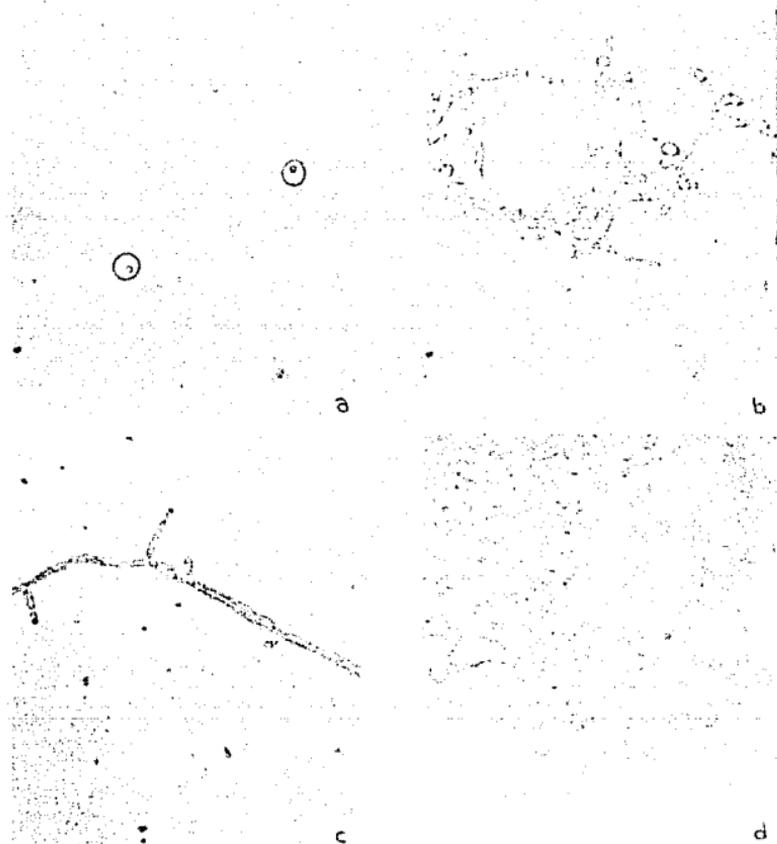
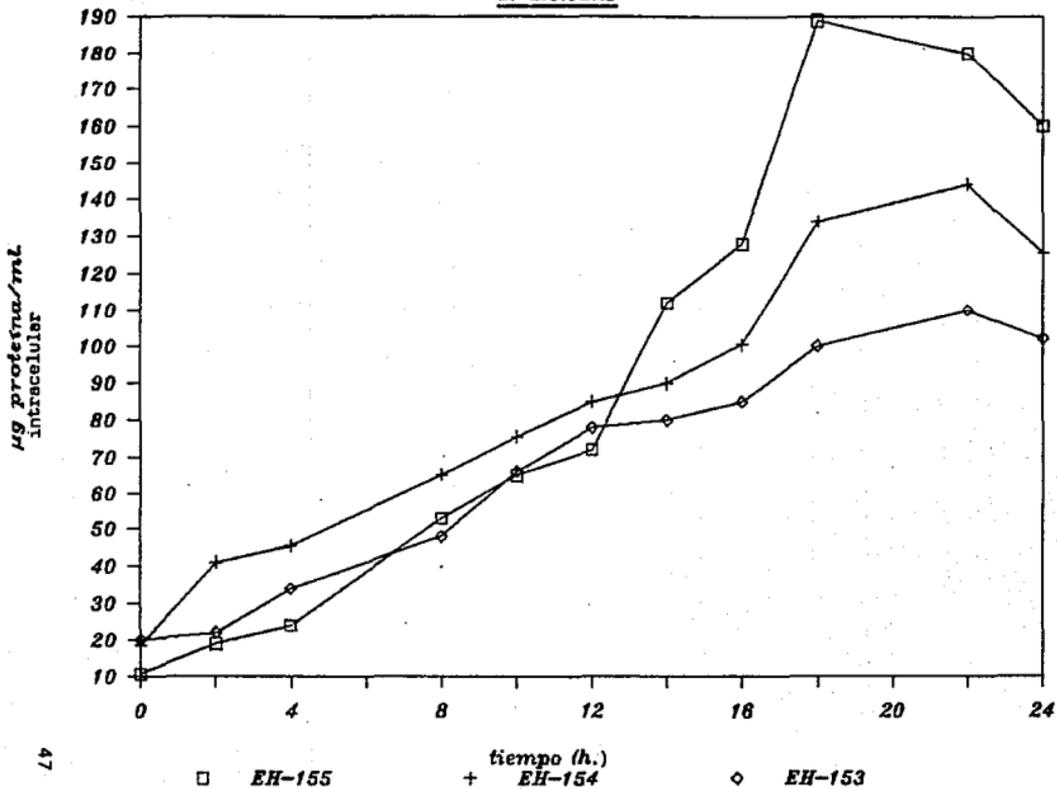


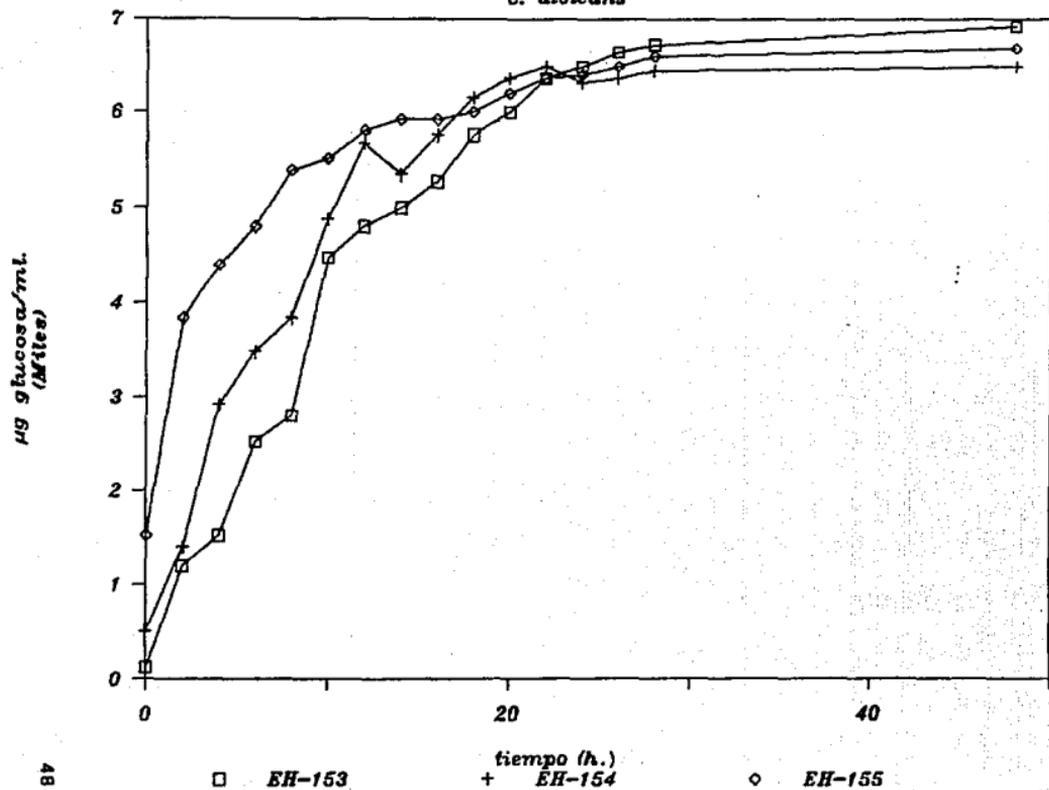
Fig.1. Secuencia de la transición de levadura a micelio de la cepa EH-155: a) Clamidoconidios iniciales a las 0 horas. b) Mezcla de levadura y pseudomicelio a las 4 horas. c) Micelio verdadero a las 8 horas. d) El 90% de estructuras miceliales a las 18 horas de incubación. (400 X).

Curva de crecimiento fase micelial

C. albicans



Curva de crecimiento fase levaduriforme
C. albicans



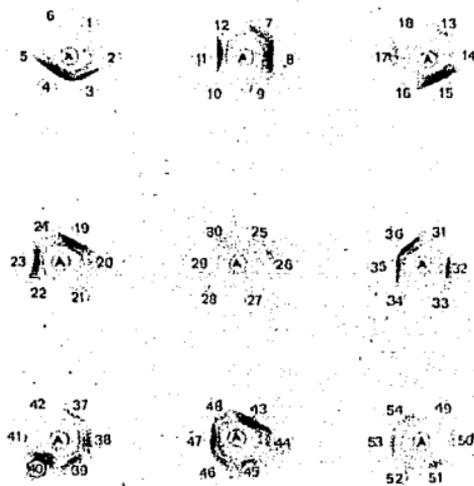


Fig.4 Inmunodifusión de Ouchterlony de un pool de sueros hiperinmunes anti-*Candida albicans* (A) con diferentes lotes (Nº) de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de la fase de levadura (L) y micelio (M) de las cepas EH-153 y EH-154 de *C. albicans*: Cepa EH-153: 1)AgmL(1), 2)AgmM(1), 3)AgcL(1), 4)AgcM(1), 5)AgmL(2), 6)AgmM(2), 7)AgcL(2), 8)AgcM(2), 9)AgmL(3), 10)AgmM(3), 11)AgcL(3), 12)AgcM(3), 13)AgmL(4), 14)AgmM(4), 15)AgcL(4), 16)AgcM(4), 17)AgmL(5), 18)AgmM(5), 19)AgcL(5), 20)AgcM(5), 21)AgmL(6), 22)AgmM(6), 23)AgcL(6), 24)AgcM(6), 25)AgmL(7), 26)AgmM(7), 27)AgmL(8), 28)AgmM(8), 29)AgmL(9), 30)AgmM(9), 31)-, 32)AgmM(10). Cepa EH-154: 33)AgmL(1), 34)AgmM(1), 35)AgcL(1), 36)AgcM(1), 37)AgmL(2), 38)AgmM(2), 39)AgcL(2), 40)AgcM(2), 41)AgmL(3), 42)AgmM(3), 43)AgcL(3), 44)AgcM(3), 45)AgmL(4), 46)AgmM(4), 47)AgcL(4), 48)AgcM(4), 49)AgmL(5), 50)AgmM(5), 51)AgcL(5), 52)AgcM(5), 53)AgmL(6), 54)AgmM(6).

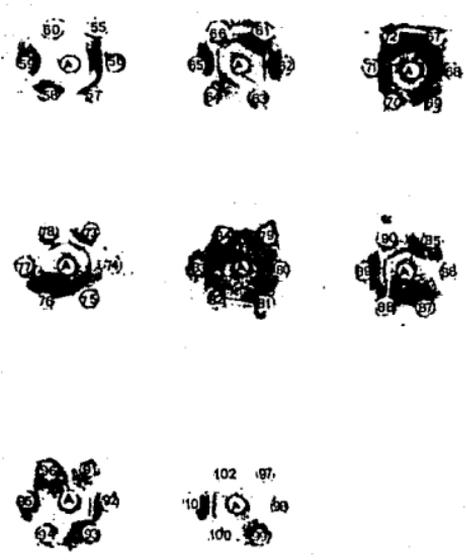


Fig.5 Inmunodifusión de Ouchterlony de un pool de sueros hiperinmunes anti-Candida albicans (A) con diferentes lotes (Nº) de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de la fase de levadura (L) y micelio (M) de las cepas EH-154 y Eh-155 de C. albicans: Cepa EH-154: 55) AgcL(6), 56) AgcM(6), 57) AgmL(7), 58) AgmM(7), 59) AgmL(8), 60) AgmM(8), 61) AgmL(9), 62) AgmM(9), 63) AgmL(10), 64) AgmM(10). Cepa EH-155: 65) AgmL(1), 66) AgmM(1), 67) AgcL(1), 68) AgcM(1), 69) AgmL(2), 70) AgmM(2), 71) AgcL(2), 72) AgcM(2), 73) AgmL(3), 74) AgmM(3), 75) AgcL(3), 76) AgcM(3), 77) AgmL(4), 78) AgmM(4), 79) AgcL(4), 80) AgcM(4), 81) AgmL(5), 82) AgmM(5), 83) AgcL(5), 84) AgcM(5), 85) AgmL(6), 86) AgmM(6), 87) AgcL(6), 88) AgcM(6), 89) AgmL(7), 90) AgmM(7), 91) AgcM(7), 92) AgmL(8), 93) AgmL(9), 94) AgmM(9), 95) AgmL(10), 96) AgmM(10), 97) AgmM(8), 98)-, 99) AgcM(8), 100)-, 101) AgcM(9), 102)-.

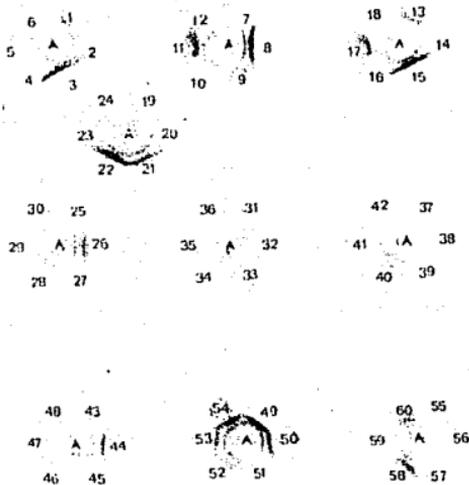


Fig. 6. Inmunodifusión de Ouchterlony en un pool de sueros hiperinmunes anti-*Candida albicans* (A) con diferentes lotes (No) de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de la fase de levadura (L) y micelio (M) de las cepas EH-153 y EH-154 de *C. albicans*: Cepa EH-153: 1)AgmL(1), 2)AgmM(1), 3)AgcL(1), 4)-, 5)- 6)-, 7)AgcL(2), 8)AgcM(2), 9)AgmL(3), 10)AgmM(3), 11)AgcL(3), 12)AgcM(3), 13)AgmL(4), 14)AgmM(4), 15)AgcL(4), 16)AgcM(4), 17)AgmL(5), 18)AgmM(5), 19)AgmL(1), 20)AgmM(1), 21)AgcL(1), 22)AgcM1, 23)AgL(2), 24)AgmM(2), 25)AgcL(5), 26)AgcM(5), 27)AgmL(6), 28)AgmM(6), 29)AgcL(6), 30)AgcM(6), 31)AgmL(7), 32)AgmM(7), 33)AgcL(7), 34)-, 35)AgmL(8), 36)AgmM(8), 37)AgcL(8), 38)-, 39)AgmL(9), 40)AgmM(9), 41)AgcL(9), 42)-, 43)-, 44)AgmM(10), 45)AgcL(10), 46)-. Cepa EH-154: 47)AgmL(1), 48)AgmM(1), 49)AgcL(1), 50)AgcM(1), 51)AgmL(2), 52)AgmM(2), 53)AgcL(2), 54)AgcM(2), 55)AgmL(3), 56)AgmM(3), 57)AgcL(3), 58)AgcM(3), 59)AgmL(4), 60)AgmM(4).

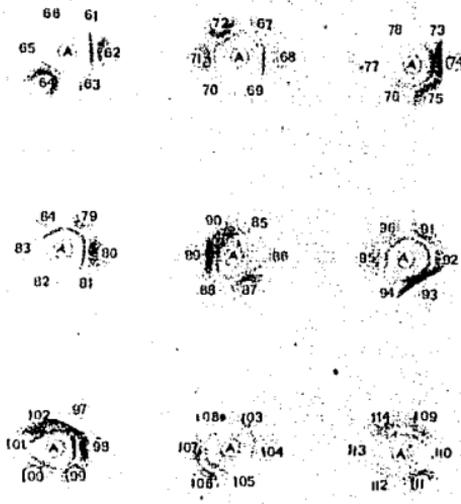


Fig.7 Inmunodifusión de Ouchterlony en un pool de sueros hiperinmunes anti-*Candida albicans* (A) con diferentes lotes (Nº) de antígenos metabólicos (Agm) y citoplásmicos (Agc) de la fase de levadura (L) y micelio (M) de las cepas EH-154 y EH-155 de *C. albicans*: Cepa EH-154: 61)AgcL(4), 62)AgcM(4), 63)AgmL(5), 64)AgmM(5), 65)AgcL(5), 66)AgcM(5), 67)AgmL(6), 68)AgmM(6), 69)-, 70)AgcM(6), 71)AgmL(7), 72)AgmM(7), 73)-, 74)Agc(7), 75)AgmL(8), 76)AgmM(8), 77)-, 78)-, 79)AgmL(9), 80)AgmM(9), 81)-, 82)-, 83)-, 84)AgmM(10), 85)-, 86)-. Cepa EH-155: 87)AgmL(1), 88)AgmM(1), 89)AgcL(1), 90)AgcM(1), 91)AgmL(2), 92)AgmM(2), 93)AgcL(2), 94)AgcM(2), 95)AgmL(3), 96)AgmM(3), 97)AgcL(3), 98)AgcM(3), 99)AgmL(4), 100)AgmM(4), 101)AgcL(4), 102)AgcM(4), 103)AgmL(5), 104)AgmM(5), 105)AgcL(5), 106)AgcM(5), 107)AgmL(6), 108)AgmM(6), 109)AgcL(6), 110)AgcM(6), 111)AgmL(7), 112)AgmM(7), 113)AgcL(7), 114)AgcM(7).

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

1. Arenas G, Toriello C. 1986. Actividad inmunologica de antigenos miceliales y levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de Sporothrix schenckii. Rev Mex Mic. 2:131-144.
2. Axelsen, N. 1973. Quantitative immunoelectrophoretic methods as tools for a polyvalent approach to standardisation in the immunochemistry of *Candida albicans*. Infect Immun. 7:949-960.
3. Calderone RA, Braun PC. 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 55:1-20.
4. Campbell MC, Stewart JL. 1980. The Medical Mycology Handbook. John Wiley and Sons. New York.
5. Casanova M, Gil ML, Cardeñoso L, Martínez JP, Sentandreu R. 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. Infect Immun. 57:262-271.
6. Casanova M, Martínez JP, Chaffin WL. 1991. Identification of germ tube cell wall antigens of Candida albicans. J Med Vet Mycol. 29:269-272.

7. Cassone A, Marconi P, Bistoni F. 1987. Cell Wall of *Candida albicans* and Host Response. *CRC Crit Rev Microbiol.* 15:87-95.

8. Chaffin WL, Szkudlarek J, Morrow KJ. 1988. Variable expression of a surface determinant during proliferation of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 56:302-309.

9. Cutler JE, Friedman L, Milner KC. 1972. Biological and chemical characterization of toxic substances from *Candida albicans*. *Infect Immun.* 6:616-627.

10. Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers, F Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* 28:350-356.

11. Elorza MV, Murgui A, Sentandreu R. 1985. Dimorphism in *Candida albicans*: Contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J Gen Microbiol.* 131:2209-2216.

12. Elorza MV, Marcilla A, Sentandreu R. 1988. Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: Nature of the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moieties. *J Gen Microbiol.* 134:2393-2403.

13. Evans EGV, Richardson MD, Odds FC, Holland KT. 1983. Relevance of antigenicity of Candida albicans growth phases to diagnosis of systemic candidiasis. Br Med T. 4:86-87.
14. Ferreira RP, Yu B, Niki Y, Armstrong D. 1990. Detection of Candida antigenuria in disseminated candidiasis by immunoblotting. J Clin Microbiol. 28:1075-1078.
15. Filice G, Yu B, Armstrong D. 1977. Immunodiffusion and agglutination test for Candida in patients with neoplastic disease: Inconsistent correlation of results with invasive infections. J Infect Dis. 135:349-357.
16. Fruit J, Cailliez JC, Odds FC, Poulain D. 1990. Expression of an epitope by surface glycoproteins of Candida albicans Variability among species, strains and yeast cells of the genus Candida. J Med Vet Mycol. 28:241-252.
17. Fukazawa Y. 1989. Antigenic Structure of Candida albicans. 2. Immunochemical basis of the serologic specificity of the mannans in yeasts. In: Kurstak E. (Ed). Immunology of Fungal Disease. Marcel Dekker, New York. pp.37-61.
18. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. 1990. Pathogenicity determinants of Candida. Mycoses. 33:265-282.

19. Glew RH, Buckley HR, Rosen HM, Moellering RC, Fischer JE. 1978. Serologic tests in the diagnosis of systemic candidiasis. Enhanced diagnostic accuracy with crossed immunoelectrophoresis. Am J Med. 64:586-590.

20. Greenfield RA. 1992. Host defense system interactions with *Candida*. J Med Vet Mycol. 30:89-104.

21. Harrell WK, Ashworth H, Britt LE, George JR, Gray SB, Green JH, Gross H, Johnson JE. 1976. Procedural manual for production of bacterial fungal parasitic reagents. 3rd edition. Public Health Service Center for Disease Control. Atlanta, Georgia.

22. Hector RF, Lyon FL, Damer JE. 1981. Immunological relatedness among *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. Infect Immun. 34:844-850.

23. Huppert M. 1982. Antigens used for measuring immunological reactivity. In: Howard DH. (Ed) Fungi pathogenic for humans and animals. Pat B. Pathogenicity and detection: II. Marcel Dekker. New York. pp.219-301.

24. Jones JM. 1980. Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of *Candida* in rabbits, mice and humans. Infect Immun. 30:78-89.

25. Jones JM. 1989. Humoral immune response to Candida albicans. In: Kurstak E. (Ed). Immunology of Fungal Disease. Marcel Dekker, New York. pp. 375-400.
26. Kniker WT, Anderson CT, Roumiantzeff M. 1979. The multi-test system: A standardized approach to evaluation of delayed hypersensitivity and cell-mediated immunity. Ann Allergy. 43:73-79.
27. Kniker WT, Lesourd BM, McBryde JL, Corriel RN. 1985. Cell-mediated immunity assessed by multitest CMI skin testing in infants and preschool children. Am J Dis Child. 139:840-845.
28. Kozinn PJ, Taschdjian CL, Goldberg PK, Protzmann WP, MacKenzie DWR, Remington JS, Anderson S, Seelig MS. 1978. Efficiency of serologic tests in the diagnosis of systemic candidiasis. Am J Clin Pathol. 70:893-898.
29. Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of Candida albicans. Sabouraudia. 13:148-153.
30. Louria DB, Brayton RG. 1964. Behaviour of Candida cells within leucocytes. Proc Soc Exp Biol Med. 115:93-99.

31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
32. Mason AB, Brandt ME, Buckley HR, 1989. Enolase activity associated with a C. albicans cytoplasmic antigen. *Yeast.* 5:231-239.
33. Matthews R, Burnie J. 1988. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-Kilodalton antigen. *J Clin Microbiol.* 26: 459-463.
34. Matthews R, Burnie J, Smith D, Clark I, Midgley J, Conolly M, Gazzard B. 1988. Candida and AIDS: Evidence for protective antibody. *Lancet.* 263-265.
35. Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. 1991. Candida mannans: chemistry, suppression of cell-mediated immunity and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev.* 4:1-19
36. Odds FC. 1985. Morphogenesis in Candida albicans. *CRC Crit Rev Microbiol.* 12:45-93.

37.Ollert MW, Calderone R. 1990. A monoclonal antibody that defines a surface antigen on Candida albicans hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts. Infect Immun. 58:625-631.

38.Ouchterlony O. 1962. Diffusion en Gel Methods for Immunological Analysis. Prog Allergy. 6:30-36.

39.Perez-Mejía A, Toriello C. 1989. Condiciones óptimas para la producción de antígenos de Aspergillus fumigatus, A. niger, y A. flavus para el diagnóstico serológico de aspergilosis. Rev Mex Mic. 5:261-271.

40.Persi MA, Burnham JC. 1981. Use of tannic acid as a fixative-mordant to improve the ultrastructural appearance of Candida albicans blastospores. Sabouraudia. 19:1-8.

41.Ponton J, Jones JM. 1986. Identification of two germ-tube-specific cell wall antigens of Candida albicans. Infect Immun. 54:864-868.

42.Poulain D, Hopwood V, Vernes A. 1985. Antigenic variability of Candida albicans. CRC Crit Rev Microbiol. 12:223-270.

43.Repentigny L, Reiss E. 1984. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. Rev Infect Dis. 6:301-312.

44.Rippon WJ. 1990. Tratado de micología médica. 3a. Edición. Interamericana McGraw-Hill. Mexico.

45.Ryley JF, Ryley NG. 1990. Candida albicans-do mycelia matter? J Med Vet Mycol. 28:225-239.

46.Saltarelli CG, Gentile KA, Mancuso SC. 1975. Lethality of Candida strains as influenced by the host. Can J Microbiol. 21:648-654.

47.Szanişzlo PJ. 1985. Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Plenum Press. New York and London.

48.Shepherd MG. 1987. Cell envelope of Candida albicans. CRC Crit Rev Microbiol. 15:7-25.

49.Soll DR. 1985. Candida albicans. In: Szanişzlo PJ. (Ed). Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans. Plenum Press. New York and London. pp. 167-195.

50. Strockbine NA, Largen ML, Zweibel SM, Buckley HR. 1984. Identification and molecular weight characterization of antigens from Candida albicans that are recognized by human sera. *Infect Immun.* 43:715-721.

51. Sundstrom PM, Nichols EJ, Kenny GE. 1987. Antigenic differences between mannoproteins of germ tubes and blastopores of Candida albicans. *Infect Immun.* 55:616-620.

52. Syverson RE, Buckley HR, Campbell CC. 1975. Cytoplasmic antigens unique to the micelial or yeast phase of Candida albicans. *Infect Immun.* 55:616-620.

53. Toriello C, Arjona-Rosado LC, Díaz-Gómez ML, Taylor ML. 1991. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses.* 34:133-140.

54. Torosantucci A, Gomez MJ, Bromuro C, Casalnuovo I, Cassone A. 1991. Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of Candida albicans. *J Med Vet Mycol.* 29:361-372.

55. Weller BI, Simmons PD, Ivanyi L. 1990. Identification of immunodominant antigens of Candida albicans in patients with superficial candidosis. Clin Immun Immunopathol. 54:347-353.

56. Young G. 1964. The process of invasion and the persistence of Candida albicans injected intraperitoneally into mice. J Infect Dis. 102:114-120.