



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

11661 #
5
\$ 2 ej.

**IDENTIFICACION DE LA ENZIMA ENOLASA
EN EL SUERO DE PACIENTES CON CANDIDOSIS
SISTEMICA MEDIANTE LA PRUEBA DIAGNOSTICA
DE ELISA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

Q.F.B. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO

**DIRECTOR DE TESIS:
M.en C. ENRIQUE SALAS TELLEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

265739

1998

**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 esta 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.

Dedicatorias.

A Jaime:

Gracias por todo tu apoyo y colaboración para la elaboración de éste trabajo desde su inicio hasta su culminación.

Sobre todo gracias por tu amor siempre dispuesto a comprender.

A mi papá:

Con gratitud, cariño y respeto por todo lo que me has brindado.

A la memoria de mi mamá y mi hermano:

Quienes permanecen presentes cada minuto de mi vida siendo una gran inspiración para continuar con el camino ya emprendido.

A mi hermana Mary, Gerardo, mis sobrinas Fredy y Beto:

Por su apoyo y por permanecer unidos.

A mis tíos Elisa, Alicia y Heriberto:

Por continuar presentes.

Agradecimientos:

Al MenC Enrique Salas Téllez:

Con infinita gratitud y afecto agradezco el apoyo, disponibilidad y actitud siempre positiva que manifestaste en la elaboración de éste trabajo. Gracias por permitirme ser parte de "los micólogos".

A la Dra. Susana E. Mendoza E.:

Gracias por el apoyo y confianza que me ha brindado y por su invaluable amistad.

A la Q.F.B. Carolina Segundo Z.:

Por sus valiosas aportaciones para la realización de éste trabajo, así como por brindarme su valiosa amistad.

Al MenC Roberto Velasco:

Mil gracias por su colaboración desinteresada en el desarrollo de una etapa fundamental de éste trabajo.

A los Drs. R. Arenas y A. Bonifaz:

Por su gran ayuda en la búsqueda de muestras séricas.

I N D I C E

T E M A	P Á G I N A
Resumen	1
1. Introducción	1
1.1 Generalidades del género <i>Candida</i>	1
2. Infecciones causadas por el género <i>Candida</i>	3
2.1 Datos históricos	3
2.2 Cuadros clínicos	4
3. Patogénesis de <i>Candida albicans</i>	6
4. Diagnóstico de <i>Candida albicans</i>	12
5. Justificación	16
6. Objetivo general	17
6.1 Objetivos específicos	17
7 Material y Métodos	18
7.1 Identificación de la cepa de referencia de <i>Candida albicans</i> ATCC 10232	18
7.2 Obtención de la enzima Enolasa de <i>C. albicans</i>	19
7.3 Identificación de la enzima Enolasa a partir de los extractos crudos mediante electroforesis SDS-PAGE	21
7.4 Purificación de la enzima Enolasa mediante cromatografía de exclusión molecular	23
7.5 Determinación de la actividad enzimática de la enzima Enolasa purificada	25
7.6 Producción de sueros hiperinmunes anti-Enolasa	26
7.7 Prueba de Dot-ELISA para la titulación de los sueros hiperinmunes	27
7.8 Identificación de la actividad antigénica de la enzima Enolasa mediante inmunotransferencia	28
7.9 Prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto	30
7.9.1 Optimización de anticuerpos (anti-ENOLASA de ratón y anti-ratón marcado con peroxidasa)	30
7.9.2 Curva estándar para la cuantificación de la enzima Enolasa de <i>C. albicans</i>	31

7.10 Identificación de la enzima Enolasa de <i>Candida albicans</i> en el suero de pacientes con candidosis sistémica	32
8. Resultados y Discusión	34
8.1 Pureza de la cepa de referencia de <i>Candida albicans</i> ATCC 10232	34
8.2 Obtención de la enzima Enolasa	36
8.2.1 Tratamiento con vortex y sonicación	36
8.3 Identificación de la enzima Enolasa a partir de los extractos crudos mediante electroforesis SDS-PAGE	37
8.4 Titulación del suero hiperinmune anti-Enolasa	41
8.5 Semipurificación de la enzima Enolasa mediante cromatografía de exclusión molecular.	41
8.6 Prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto	50
8.7 Identificación y cuantificación de la enzima Enolasa de <i>Candida albicans</i> en el suero de pacientes con candidosis sistémica	52
9. Conclusiones	55
10. Apéndice I	57
11. Bibliografía	64

RESUMEN.

A partir de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10232, se realizaron tratamientos con vortex y sonicación a fin de obtener y liberar las proteínas constitutivas de esta levadura. De los tratamientos mencionados anteriormente se obtuvo una concentración de proteínas de 1.29 y 1.39 mg/ml respectivamente, por lo que a lo largo de éste estudio se optó por emplear el tratamiento con vortex, ya que este resulta ser más rápido de realizar y los resultados obtenidos en ambos tratamientos son muy similares.

Las proteínas obtenidas fueron identificadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%, demostrándose la presencia de la enzima Enolasa, la cual posee un peso molecular de 48 kDa y presenta un corrimiento electroforético similar a la Enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* la cual se empleo como control de referencia.

Con la finalidad de realizar la semipurificación de la enzima Enolasa se emplearon diversas precipitaciones con sulfato de amonio a diferentes concentraciones para finalmente someter la muestra a cromatografía de exclusión molecular, empleando dos tipos de Sephadex el G 100-120 y G 25.

Resultó así que la concentración de proteínas obtenida después de las precipitaciones con sulfato de amonio fue de 51.13 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ mostrándo en la prueba de actividad enzimática 20.0 μmol de producto formado/minuto/2ml, además de que se mantiene presente en el corrimiento electroforético una proteína con un peso molecular de 48 kDa. En el caso Sephadex G 25 se observa una aceptable separación de proteínas, lo cual se observa en la gráfica en donde se registran los valores de absorbancia de cada fracción cromatográfica leídos a una longitud de onda de 280 nm, las fracciones que presentaron mayores lecturas de absorbancia se agruparon y se les determinó actividad enzimática las cuales mostrarón una lectura inicial de 0.028 μmol de producto formado/minuto/10 μl y una final de 0.018 μmol de producto formado/minuto/10 μl . En el Sephadex G 100-120 no se observa la misma separación en la gráfica donde se registran los valores de absorbancia de cada fracción cromatográfica leídos a una longitud de onda de 280 nm, las fracciones que presentaron mayores lecturas de absorbancia se agruparon y se les determinó cuantificación de proteínas presentando un valor inicial de 87.94 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ y una final de 43.24 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, en la determinación de la actividad antigénica la cual fue realizada por Western-blot con sueros hiperinmunes anti-Enolasa se observa la presencia de bandas de reconocimiento antigénico, en el corrimiento electroforético SDS-PAGE 10% tiñendo con Nitrato de plata se mantiene presente una proteína con un peso molecular de 48 kDa.

Se realizó la estandarización de la prueba de ELISA indirecta empleando el paquete diagnóstico ELISA-MATE, con los sueros hiperinmunes producidos contra la enzima Enolasa en ratón (1:64) y anticuerpos anti-ratón marcado con peroxidasa a una dilución óptima de 1:6 de una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ambos en un volumen de 50 μl .

Se empleo el suero de cuatro pacientes sospechosos a candidosis sistémica, en donde se identificó a la enzima Enolasa en el suero de tres pacientes con candidosis sistémica, un suero de paciente con criptococosis, empleandose como controles positivos a la enzima Enolasa de *Sacharomyces cerevisiae* y la de *Candida albicans* semipurificada en el presente trabajo. Los controles positivos presentan un valor de 1.86 mg de Enolasa/50 μl y 1.46 en la enzima semipurificada. Se diagnosticó a los tres primeros pacientes candidosis sistémica, los cuales mostraron un valor cada uno de 1.577 μg de enzima Enolasa/50 μl , 1.349 μg de enzima Enolasa/50 μl , 0.605 μg de enzima Enolasa/50 μl además de aislarse en hemocultivo células levaduriformes de *Candida albicans* respectivamente y el cuarto suero no presento a la enzima Enolasa pero en el hemocultivo se aisló a *Cryptococcus neoformans* diagnosticándose criptococosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Candida*.

El género *Candida* se encuentra formado por hongos que presentan la forma unicelular (levadura) como fase predominante y por algunas especies que pueden llegar a presentar una fase pluricelular (micelio verdadero), pasando por una etapa intermedia denominada tubo germinativo, son aeróbicas, se reproducen por gemación y en cultivo se observan como colonias cóncavas, cremosas, de color blanco o café según sea el medio empleado. (Campos,1991; Salas, 1995).

El género *Candida* presenta las siguientes características taxonómicas (Arenas, 1993; Salas, 1995):

Reino: *Fungi*.

Phylum: *Deuteromycota*.

Clase: *Blastomycetos*.

Familia: *Cryptococcaceae*.

Candida albicans (*C. albicans*) se ha dividido en varios biotipos, y por sus características antigénicas, en los serotipos A y B; el primero está relacionado con *Candida tropicalis* y el segundo, con *Candida stellatoidea*, que algunos consideran

2. INFECCIONES CAUSADAS POR *Candida albicans* (CANDIDOSIS).

2.1 Datos históricos:

Candidosis es la infección causada por especies del género *Candida*. La enfermedad fue introducida inicialmente en 1751 dentro del género *Monilia*, que se asocio con el algodoncillo a fines del siglo XIX. En 1887 Plaut aisló a partir de madera un hongo semejante a una levadura relacionandolo con el algodoncillo en tráqueas de pollos considerando su aislamiento idéntico a *Monilia candida*. En 1890 Zopf nombró al hongo del algodoncillo como *Monilia albicans*, nombre que permaneció por varias decadas y que describía como moniliasis a las infecciones causadas por el hongo del algodoncillo (Kwon-Chung, 1992; Salas, 1995).

Langenbeck en 1839 demostró la presencia de un hongo levaduriforme en las lesiones de aftas bucales en un caso de tifo, aunque nombró erróneamente como el agente causal de esta enfermedad. En 1846 Berg fué el primero en describir completamente la relación entre el hongo y las lesiones bucales. En 1892 D. Gruby describió ante la Academia de Ciencias de París al hongo del verdadero algodoncillo en niños, colocando al hongo aislado por Langenbeck en el género *Sporotrichum*; Robin, en 1853 lo denominó *Oidium albicans*. En 1868 Quinquad propuso el nombre *Syringospora robinii* y en 1877 Reess nombro al hongo como *Saccharomyces albicans* (Salas, 1995).

Finalmente la clasificación taxonómica de *Candida* fue esclarecida en 1923 por Berkhout quien sugirió el nombre genérico de *Candida*, adoptado formalmente a nivel internacional. A principios de este siglo Castellani realizó extensas investigaciones de las micosis siendo el primero en sugerir que las especies de levaduras involucradas en la patogénesis de la candidosis son distintas a la *Monillia albicans* (Odds, 1979; Chaparro, 1993).

2.2 Cuadros clínicos:

C. albicans puede producir infección en el organismo cuando los mecanismos de defensa se encuentran deteriorados originando una candidosis, la cual puede ser localizada y en ocasiones puede pasar a sistémica. Algunos factores que desencadenan ésta infección pueden ser el uso de antimicrobianos de amplio espectro y por largos periodos de tiempo, drogas inmunosupresoras, pacientes con deficiencia inmune celular (SIDA), etc. (Krick et. al., 1981); o también a consecuencia de cambios fisiológicos de la flora normal, por ejemplo durante la instalación de la flora normal en recién nacidos o eliminación de la flora bacteriana normal; por cambios en el metabolismo de carbohidratos, pacientes con diabetes; incluso se origina por una dermatitis irritativa iniciada por oclusión cutánea. (Arenas, 1993).

Las infecciones causadas por *C. albicans* se pueden manifestar en diversos grados de severidad que pueden ser desde un problema superficial de piel, una infección

3. PATOGÉNESIS DE *Candida albicans*.

Las infecciones causadas por el género *Candida* surgen como una serie de pasos, en donde inicialmente ocurre la adhesión a una superficie de células epiteliales y posteriormente la colonización. En situaciones en donde el hongo es hábil para penetrar a la circulación sanguínea es necesario que exista la expresión por parte de éste de ciertos factores los cuales evadan las defensas celulares por parte del hospedero (Agabian et al., 1994).

Se han realizado varios estudios para lograr definir los mecanismos patogénicos realizados por *C. albicans*, resaltando los múltiples factores predisponentes del hospedero que le permite a ésta levadura causar infección, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, atribuyéndose a los siguientes procesos:

i) Desequilibrio de la flora normal microbiana ocasionado por un incremento en la presencia de levaduras como *Candida* que puede deberse a cambios de pH, acúmulos de nutrientes como glucógeno y disminución de la flora normal bacteriana por la administración de antibióticos.

ii) Por enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, como es el caso de disminución en la cantidad y actividad de polimorfonucleares (PMN), células T y B. Experimentalmente se ha observado en

ratones atímicos e infectados con *C. albicans* que la actividad anormal de linfocitos y macrófagos favorece la resolución de las lesiones por otro lado, cantidades adecuadas de células fagocíticas funcionalmente activas, especialmente neutrófilos parecen ser importantes en la prevención de la diseminación del hongo, así como su proliferación en tejidos durante la infección. Se ha encontrado que aún en ausencia de linfocitos T funcionales y una flora normal bacteriana normal el hospedero presenta resistencia a una candidosis diseminada (Bonifaz, 1990; Lee et al., 1983).

Cuando *Candida* se encuentra en torrente sanguíneo, el principal mecanismo de defensa se relaciona con la actividad de los linfocitos polimorfonucleares, ocurriendo un marcado progreso y diseminación de la infección en ausencia de un número adecuado de neutrófilos (neutropenia), o bien retardo en su movilización como es el caso de terapias con corticosteroides, y deficiencia en la actividad normal de células fagocíticas (Salas, 1995).

Por otro lado, se menciona que existe una resistencia natural a la infección, pero no está bien definida, quizá dependa de factores de inhibición inespecíficos, concentraciones séricas elevadas de hierro, potenciales de óxido-reducción y competencia entre levaduras por nutrientes (Arenas, 1993).

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo o drogadicción, ya que en ésta forma se inoculan directamente los microorganismos al torrente sanguíneo. Como en los pacientes hospitalizados, el uso de drogas antibacterianas, inmunosupresoras y citotóxicas incrementan la incidencia de candidosis invasiva (Deventer et al., 1994).

Por otro lado, se ha atribuido la patogenicidad de *C. albicans* a la actividad de algunos productos fúngicos como enzimas proteolíticas, metabolitos, los cuales se encuentran circulando en el torrente sanguíneo de pacientes que presentan infecciones sistémicas (Sundstrom et al., 1994).

Para que se lleve a cabo la infección por *C. albicans* en el hospedero es necesaria la adhesión de la levadura a su tejido. La adhesión es compleja ya que se involucran procesos multifactoriales como la presencia de un factor de virulencia con características protéicas de manoproteína el cual se localiza en la capa externa fibrilar de *C. albicans* (Critchley et al., 1987), así como la característica propia de hidrofobicidad; desencadenando finalmente en la implantación de la levadura en el tejido del hospedero (Douglas, 1987; Kennedy et al., 1992). La adhesión a células epiteliales bucales se ve disminuida por la presencia de agentes antifúngicos los cuales pueden inhibir la formación de tubo germinal, sugiriéndose la presencia de un factor que une al fibrinógeno fuertemente con la superficie de los tubos germinales e hifas (Bouali et al., 1987); también se ha encontrado que las levaduras tienen una gran capacidad de unirse a la fibronectina por lo que se sugiere la presencia de ésta proteína como un factor importante en el caso de endocarditis (Calderone et al., 1985).

Después de la entrada, adhesión e implantación de *C. albicans* a las células de la mucosa del hospedero, si las situaciones son apropiadas ocurrirá la diseminación a partir de lesiones en las mucosas infectadas o bien el aumento en la población de levaduras presentes a nivel intestinal o bien la eliminación de microorganismos

4. DIAGNÓSTICO DE *C. albicans*.

Se ha observado que las infecciones nosocomiales sistémicas causadas por *C. albicans* se han incrementado presentando una alta morbilidad y mortalidad, la candidemia es la cuarta causa más común de septicémias nosocomiales en los Estados Unidos de América en donde el 8% de los pacientes hospitalizados adquieren ésta infección (Kotaro et al., 1996). El rango de mortalidad entre pacientes con candidemia es mayor que las infecciones bacterianas comúnmente encontradas (Matthews, 1996).

Para realizar un diagnóstico de laboratorio de candidosis es necesario establecer el tipo de muestra la cual dependerá de la presentación de ésta infección pudiendo ser exudados, escamas, sangre, esputo, orina, líquido cefalorraquídeo, etc. a partir de la cual se realizará el aislamiento y diversas pruebas de identificación de la levadura (Bonifaz, 1990).

En el caso de una candidosis de tipo sistémico es difícil establecer un diagnóstico rápido y certero. Los métodos empleados en el laboratorio para la identificación de la levadura se basan principalmente en la prueba de tubo germinal, producción de clamidosporas y la habilidad de asimilar y fermentar carbohidratos (auxonograma y zimograma respectivamente); las dos últimas pruebas tardan de 2 a 3 días, por otro lado el tubo germinal y la producción de clamidosporas se realiza en dos y 24 horas respectivamente; sin embargo, es importante considerar que las cepas de *C. albicans* no formadoras de tubo germinal representan del 1-2% del total de

5. JUSTIFICACION

Debido al incremento en las infecciones sistémicas causadas por *Candida albicans*, un diagnóstico temprano y preciso surge como una necesidad cada vez más importante.

En la actualidad los métodos usados en el laboratorio clínico para la identificación de *Candida albicans* se basan principalmente en tubo germinativo y la observación al microscopio mediante la tinción de Gram. La identificación anterior puede llegar a tardar de 2-3 días dependiendo de la dificultad que se tenga para realizar el diagnóstico; por otro lado, aparecen las pruebas inmunológicas como nuevas alternativas para el diagnóstico se ha basado en la detección de dos clases de antígenos uno lábil al calor (glucoproteína) y el otro estable (mananas).

La determinación de la enzima Enolasa en el suero de pacientes con candidosis sistémica mediante el desarrollo de una prueba altamente sensible y específica como lo es la prueba de ELISA, permitirá un diagnóstico temprano de la enfermedad lo que resultará en un tratamiento clínico oportuno.

6. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Detectar la presencia de la enzima Enolasa de *Candida albicans* en el suero de pacientes con candidosis sistémica, mediante la prueba diagnóstica de ELISA.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Obtener, identificar y semipurificar a la enzima Enolasa a partir de la cepa de referencia ATCC 10232 de *Candida albicans*.
- ❖ Estandarizar la prueba para determinar la actividad enzimática de la enzima Enolasa.
- ❖ Producir suero hiperinmune anti-Enolasa.
- ❖ Desarrollar la prueba diagnóstica de ELISA para determinar la presencia de la enzima Enolasa en el suero de pacientes con candidosis sistémica.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE REFERENCIA DE *Candida albicans* ATCC 10232.

A continuación se describen las pruebas de laboratorio que se realizaron a la cepa de referencia para confirmar como *Candida albicans* (*C. albicans*); se utilizó como control negativo en cada determinación una cepa de *Candida krusei* (*C. krusei*). Ambas cepas fueron donadas por el laboratorio de Micología Médica de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

7.1.1 Producción de Tubo germinativo: Esta prueba ayuda a diferenciar especies de *Candida*. Se tomó una pequeña asada de levaduras de *C. albicans* y se suspendió en 0.5 ml. de suero de equino. La mezcla se incubó a 37 C por 3 horas, pasado este tiempo se tomó una pequeña muestra y se observó al microscopio (Segundo, 1991).

7.1.2 Producción de Clamidosporas: La producción de clamidosporas (esporas esféricas de doble pared), es una característica de especies de *Candida* principalmente de *albicans*. La cepa se sembró por la técnica de rasgado o sandwich en agar Czapek Dox adicionado de Tween 80. Se incubó a 28 C revisando al microscopio cada 24 horas hasta observar la formación de estas estructuras (Segundo, 1991).

7.1.3 Tolerancia a pH ácido: Esta prueba permite diferenciar a *C. albicans* de otras especies, ya que el rango de crecimiento de esta levadura es en pH 1.2-1.5. Para realizar ésta prueba se prepararon tubos con caldo Czapek Dox a pH 1.1, 1.3 y 1.5, los cuales fueron inoculados suspendiendo una pequeña asada de levaduras en cada tubo, se incubó a 37 C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se observó el crecimiento (Segundo, 1991).

7.1.4 Auxonograma y Zimograma: Estas pruebas ayudaron a la identificación de género y especie de *C. albicans*.

Para los auxonogramas se preparó un medio base peptonado (sin carbohidratos), los cuales fueron colocados posteriormente en forma de sensidiscos empleando D-Glucosa, Galactosa y Maltosa a una concentración de 2%; se incubaron a 25 C, 5 días; los carbohidratos utilizados fueron D-Glucosa, Galactosa y Maltosa.

Para el zimograma se preparó medio líquido (sin carbohidratos), se adicionó rojo de fenol y los carbohidratos D-Glucosa, Maltosa, Galactosa a una concentración de 3%, en cada tubo se empleó un tubo Durham, y se incubó 37 C por 2 días (Segundo, 1991).

7.2 OBTENCION DE LA ENZIMA ENOLASA.

Partiendo de un crecimiento de 24 horas en medio de Agar Dextrosa Saboraud (SDA) (ver apéndice I) de células levaduriformes aisladas e identificadas como *C.*

albicans se procedió al crecimiento en medio de Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) (ver apéndice I), incubando 37 C durante 24 horas en agitación constante de 200 r.p.m. Transcurrido éste tiempo el medio fue centrifugado a 2,000 rpm durante 10 min., se descarto en cada una el sobrenadante y guardó la biomasa en refrigeración. Posteriormente todas las células obtenidas fueron lavadas 2 veces con agua destilada estéril. A la biomasa se le realizaron los tratamientos de vortex y sonicación para obtener la enzima Enolasa (Franklyn, et al., 1990).

7.2.1 Tratamiento con vortex: En un tubo de plástico estéril se agregó 1 ml. de amortiguador lisis pH 7.4 (ver apéndice I), se adicionó 2 ml. de levaduras de *C. albicans* con una concentración de 10^{10} células, además un volúmen de perlas de vidrio; esta suspensión anterior fue sometida a la acción del vortex por periodos cortos hasta acumular un total 4 horas a 4 C. Finalmente toda la suspensión se clarificó centrifugando a 3,000 rpm en una centrifuga de alta velocidad Beckman Óptima modelo LE80K durante 10 minutos, se desechó la pastilla y guardo el sobrenadante en refrigeración después de ser dializado contra TBS pH 7.5 a 4 C (ver apéndice 1), éste último se etiquetó como **BIOMASA** (Franklyn, et al., 1990).

7.2.2 Tratamiento con sonicacion: Se preparó una suspensión de 2 ml. levaduras de *C. albicans* a una concentración de 10^{10} células, las cuales se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se centrifugaron a 1,500 g durante 10 minutos. El paquete celular obtenido al final de estos lavados fue disuelto con 20 ml

(*S. cerevisiae*) E.C.4.2.1.1, SIGMA, USA), marcadores de peso molecular (Gibco BRL) y células completas de *C. albicans* con los tratamientos respectivos para cada una de las muestras.

Las biomasas de *C. albicans* obtenidos de ambos tratamientos y el control de referencia se diluyeron en una relación 1:4 con la solución digestora sometiéndolos 5 minutos a ebullición en baño maría, colocándose 20 μ l de cada muestra en los pozos. Los marcadores de peso molecular no recibieron ningún tratamiento previo; se colocaron 20 μ l de muestra al pozo.

Marcadores de peso molecular empleados:

Miosina (200 Kda)

Fosforilasa B (97.4 Kda)

Albúmina sérica bovina (68 Kda)

Ovoalbúmina (43 Kda)

Anhidrasa carbónica (29 Kda)

β -Lactoglobulina (18.4 Kda)

Lisozima (14.3 Kda)

Las condiciones de corrimiento fueron a un voltaje constante de 180 volts durante 45 minutos.

Posterior al corrimiento se tiñeron las bandas de proteínas presentes en el gel, para lo cual se colocaron en la solución teñidora I (ver apéndice I) durante 3-4 horas, después se destiñeron con la solución desteñidora I (ver apéndice I) durante 1-3 horas; finalmente el gel se sumergió en la solución desteñidora II (ver apéndice I) (Laemmli, 1970).

Para determinar el peso molecular de las proteínas observadas en el gel del corrimiento electroforético se construyó una curva estándar con los datos de las proteínas de marcadores de peso molecular, para lo cual se determinó el coeficiente de movilidad relativa (Rf) de cada proteína contra Log 10[SEVM1] del peso molecular de cada una en KiloDaltons (KDa) (ver gráfica 1):

$$\text{Movilidad relativa} = \frac{\text{Distancia de migración de cada proteína}}{\text{Distancia total del frente de corrimiento}}$$

Los pesos moleculares de 48 kDa determinados tanto en las biomasas como en el control positivo se obtuvieron interpolando cada uno de los Rf sobre la curva estándar, el antilogaritmo del valor resultante fue el peso molecular de la proteína.

7.4 SEMIPURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

A partir de la biomasa obtenida por el tratamiento con vortex se realizó la siguiente metodología para la precipitación de proteínas:

a) Se preparó una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y ésta fue adicionada a la biomasa en una relación de 50% volúmen/volúmen (v/v), agregando gota a gota a 4 C y en agitación constante; la suspensión obtenida se sometió a centrifugación a 18,000 rp.m. durante 1 hora, el precipitado obtenido se descartó y el sobrenadante se conservo.

b) Se preparó una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 67% agregándose al sobrenadante obtenido en una relación 50% v/v, gota a gota y 4 C. La suspensión obtenida se

centrifugó a 18,000 r.p.m. durante 1 hora. Se descartó el precipitado obtenido y el sobrenadante se conservó.

c) Se preparó una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% adicionando gota al último sobrenadante en relación 50% v/v a 4 C. La suspensión obtenida se centrifugó a 18,000 r.p.m. durante 1 hora; se descartó el sobrenadante obtenido y la biomasa se sometió a diálisis con TBS-HCl pH 7.5 (ver apéndice I) a 4 C durante 24 horas.

Se empaquetaron dos columnas cromatográfica una con Sephadex G 100-120 y la otra con Sephadex G-25, (ambas de Pharmacia LKB). Después de la diálisis se adicionó a la columna 2 ml de la biomasa obtenida a partir de las precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suspendida en TBS pH 7.5 (ver apéndice I). Se realizó el corrimiento cromatográfico, recolectándose en ambas columnas 1.5 ml por cada fracción y se registraron las absorbancias de cada una a 280 nm.

Las fracciones obtenidas a partir de ambas columnas cromatográficas y que mostraron mayor cantidad de proteínas se sometieron a electroforesis a las condiciones anteriormente descritas tiñendo con AgNO_3 , además de realizar la prueba de actividad enzimática. Para cada una de las determinaciones se ocupó como control positivo la enzima Enolasa de *S. cerevisiae* (E.C. 4.2.1.1, SIGMA).

La tinción con AgNO_3 se realizó con la siguiente metodología:

- 1.- Se sumergió el gel electroforético en metanol 50% durante una hora.
- 2.- Se tiñó el gel con la solución teñidora (ver apéndice I) durante cinco minutos en agitación constante.
- 3.- Se lavó el gel con agua desionizada durante cinco minutos en agitación constante.
- 4.- Se realizó el revelado de proteínas presentes en el gel sumergiéndolo en la solución reveladora (ver apéndice 1) de 10-15 minutos.
- 5.- El gel se conservó en agua desionizada para posteriormente medir los R_f , y correlacionar con los marcadores de peso molecular.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA SEMIPURIFICADA.

La actividad enzimática se realizó a las fracciones obtenidas a partir de cada corrimiento cromatográfico las cuales mostraron mayor cantidad de proteínas totales, además del control positivo de la enzima Enolasa de *S. cerevisiae* E.C.

4.2.1.11.

Metodología:

Se colocaron en una cubeta de cuarzo 50 μl de amortiguador Tris 50 mM pH 7.5 (ver apéndice I), 100 μl . de Cloruro de magnesio 0.01 mM, 275 μl de agua desionizada, 100 μl de ácido-2-P-D-glicérico y 25 μl de enzima Enolasa, se mezclaron y

rápidamente se realizó la lectura en el espectrofotómetro; tomando lecturas subsecuentes a una longitud de onda de 230 nm durante 1 minuto en un Espectrofotómetro Philips analítico UV/Visible modelo PU8710. La lectura final es el promedio de las lecturas en donde se observa un comportamiento lineal. El resultado de estas lecturas se expresa como μmol de producto formado/minuto (Mc Alister, et. al.,1982).

7.6 PRODUCCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES ANTI-ENOLASA.

7.6.1 En ratón:

Se utilizaron tres ratones machos con un peso de 18.5 gr. cada uno, uno fue utilizado como control y los dos restantes fueron inoculados con la enzima Enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) E.C. 4.2.1.11, siguiendo el siguiente protocolo de inmunización (Gavilondo, 1995):

- ❖ Día cero: Inoculación de 0.5 mg de enzima más 0.25 ml. de Adyuvante Completo de Freund (A.C.F.). Vía subcutánea.
- ❖ Día 8: Inoculación de 0.5 mg de enzima. Vía subcutánea.
- ❖ Día 16: Inoculación de 0.5 mg de enzima. Vía subcutánea.
- ❖ Día 20: Toma de muestra sanguínea ratón control e inoculados.

7.6.2 En conejo:

Se utilizó un conejo macho de la raza Nueva Zelanda de 2.0 Kg de peso al cual se le inoculó la enzima Enolasa de referencia de *S. cerevisiae* (3mg/ml), con el siguiente protocolo de inmunización (Gavilondo, 1995):

- ❖ Día cero: Titulación de suero. Inoculación de 0.5 ml. de la suspensión de enzima más 0.5 ml. A.C.F. por vía intramuscular.
- ❖ Día 15: Inoculación de 0.5 ml. de la suspensión de enzima más 0.5 ml. de Adyuvante Incompleto de Freund (A.I.F.) por vía intramuscular.
- ❖ Día 30: Titulación de suero.
- ❖ Día 46: Titulación de suero. Toma de muestra por punción cardiaca.

La presencia de anticuerpos anti-Enolasa tanto en ratón como en conejo se determinó mediante inmunotransferencia y su titulación mediante la prueba de Dot-ELISA.

7.7 PRUEBA DE DOT-ELISA PARA LA TITULACIÓN DE LOS SUEROS HIPERINMUNES.

Se cortaron pequeños círculos de membrana de nitrocelulosa No. N-2764 SIGMA del tamaño de los pozos de la placa de ELISA, los necesarios para cada titulación.

- 1.- Se dejó adsorber durante 24 horas a 37 C 20 μ l de antígeno en papel de nitrocelulosa.
- 2.- Se realizaron 3 lavados a la membrana de nitrocelulosa con 100 μ l de TBS pH 7.5 (ver apéndice I), esperando 10 minutos entre cada lavado.

- 3.- Se bloqueo durante 1 hora a la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 5% (ver apéndice I).
- 4.- Se realizaron 3 lavados a la membrana de nitrocelulosa con 100 μ l de TBS pH 7.5 (ver apéndice I), esperando 10 minutos entre cada lavado.
- 5.- Se adicionó 50 μ l de suero hiperinmune (anti-Enolasa de conejo y ratón) incubando a 37 C durante 2 horas.
- 6.- Se realizaron 3 lavados a la membrana de nitrocelulosa con 100 μ l de TBS pH 7.5 (ver apéndice I), esperando 10 minutos entre cada lavado.
- 7.- Se adicionó 100 μ l de Proteína A peroxidada, y se incubó a 37 C durante 1 hora.
- 8.- Se realizaron 3 lavados a la membrana de nitrocelulosa con 100 μ l de TBS, y se dejó 10 minutos entre cada lavado.
- 9.- Se adicionó 100 μ l de la solución reveladora (α -Cloronaftol) durante 30 minutos a temperatura ambiente o bien, a la aparición de color. Finalmente se retiró la solución reveladora y se enjuago con agua destilada.
- 10.- La identificación del título de cada dilución de los respectivos sueros se determinó mediante la visualización de la intensidad de coloración desarrollada (Gavilondo, 1995).

7.8 IDENTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIGÉNICA DE LA ENZIMA ENOLASA SEMIPURIFICADA DE *C. albicans* MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA.

Se llevó acabo la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% por el método de Laemmli (Laemmli, 1970) a la enzima semipurificada por cromatografía de exclusión

a temperatura ambiente y en agitación constante. Finalmente las tiras de nitrocelulosa fueron reveladas con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) y α -Cloronaftol (ver apéndice I) (Towbin, 1979).

7.9 PRUEBA DIAGNÓSTICA DE ELISA INDIRECTO.

7.9.1 Optimización de anticuerpos (anti-Enolasa de ratón y anti-ratón marcado con peroxidasa).

Los reactivos utilizados tanto para la estandarización de la prueba de ELISA, como para la cuantificación de la enzima Enolasa en las muestras séricas fueron del paquete diagnóstico "ELISAmate" (54-62-00) de Laboratorios Kirkegaard and Perry. Cada una de las optimizaciones de anticuerpos se realizó por triplicado.

La metodología empleada fue la siguiente:

- 1.- Se colocaron 50 μ l de la enzima Enolasa (de referencia de *S. cerevisiae* E.C. 4.2.1.11., SIGMA) a una concentración de 5 μ g/ml para lo cual se disolvió en albúmina sérica bovina (ABS) (ver apéndice I), se incubó durante 1 hora a 37 C, transcurrido éste tiempo se desechó el líquido residual.
- 2.- Se adicionó 100 μ l de ABS (ver apéndice I). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retiró completamente la solución residual.
- 3.- Se adicionaron 50 μ l del anticuerpo de ratón anti-Enolasa el cual previamente fué titulado mediante la prueba de Dot-ELISA la cual se describe anteriormente y en donde se obtuvo un título de 1:128 y a partir del primer pozo de la placa se

realizaron diluciones dobles como se muestra en la figura 1. Se Incubó 1 hora a 37 C, retirando completamente la solución residual de anticuerpos.

4.- Se realizaron 4 lavados con la solución de lavado, cada uno de 5 minutos en agitación constante.

5.- Se adicionaron 25 μ l del anticuerpo de ratón marcado con peroxidasa el cual forma parte del paquete diagnóstico a una concentración de 1 μ g/ml el cual forma parte del paquete diagnóstico. Se incubaron por 1 hora a 37 C y se retiró completamente la solución restante de anticuerpos .

6.- Se realizaron 4 lavados como se indica anteriormente.

7.- Se adicionar 50 μ l del que consiste en una solución 50% de Sustrato de peroxidasa 2,2 azino-bis(etilenbentiazolina-6-ácidosulfanílico) (ABTS). Dejandose reposar a temperatura ambiente hasta la aparición de color.

8.- Se adicionaron 50 μ l de solución de detención de la reacción. La lectura se realizó de acuerdo a la visualización de color.

La figura 1 indica la manera en que se realizaron las diluciones tanto del anticuerpo de ratón anti-Enolasa y del anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa.

7.9.2 Curva estándar para la cuantificación de la enzima Enolasa de *C. albicans*.

Después de realizar la estandarización de los reactivos como de anticuerpos (anti-Enolasa de *C. albicans* producido en ratón y anti-ratón marcado con peroxidasa) que se utilizaron en la prueba diagnóstica de ELISA se procedió a realizar la curva estándar para determinar la concentración de la enzima, que en éste caso juega el papel de antígeno tanto en las muestras séricas como en la enzima semipurificada.

La metodología empleada consistió en realizar diluciones dobles de la enzima Enolasa de referencia de *S. cerevisiae* partiendo de una concentración inicial de 2.5 µg/50 µl y los pasos siguientes son los mismos que se indican en la estandarización de anticuerpos mediante la prueba de ELISA de tipo indirecto, empleando un pozo de la placa como blanco.

Las lecturas se realizaron en un lector de ELISA modelo 450 BIO-RAD a una longitud de onda de 405 nm.

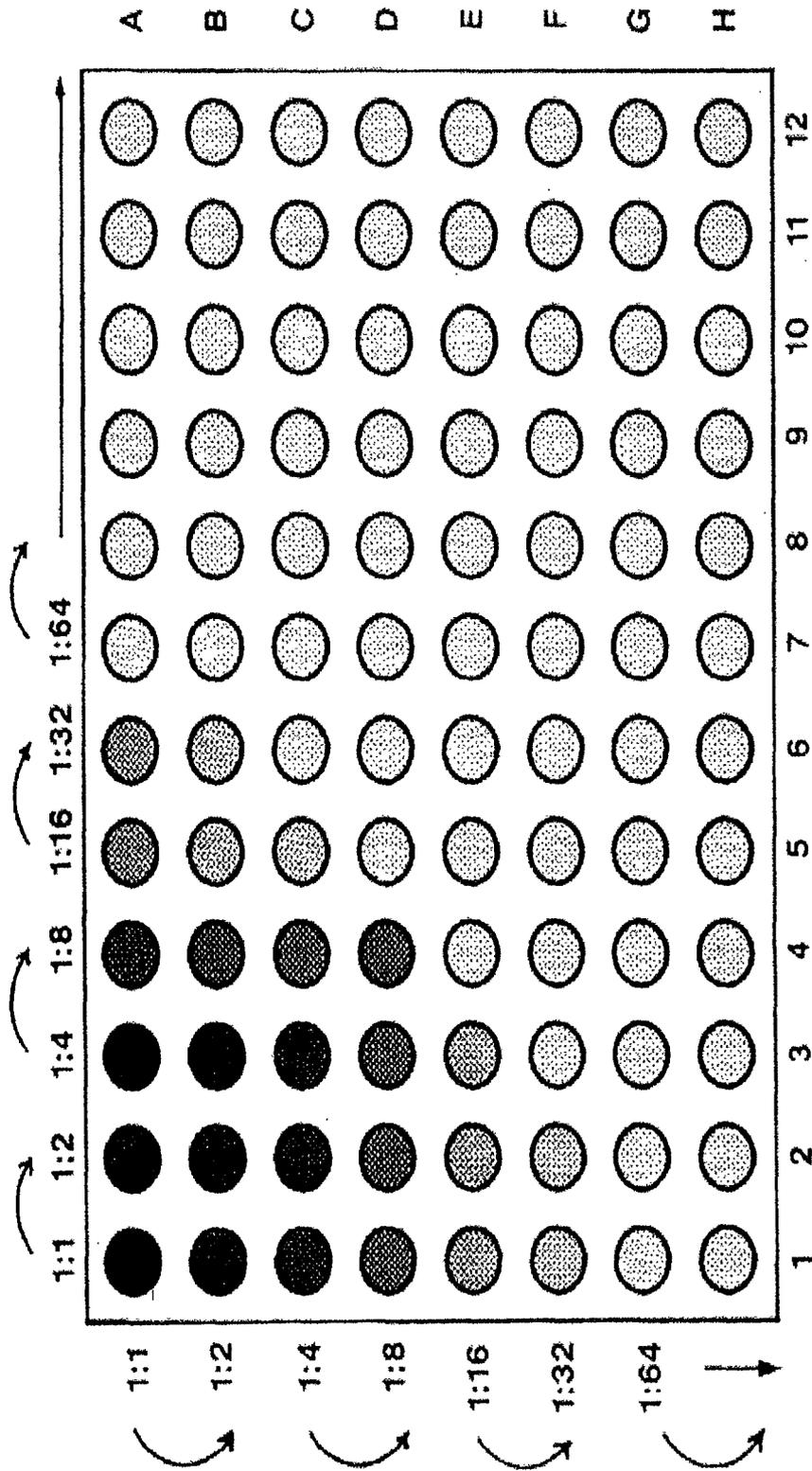
7.10 IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *C. albicans* EN EL SUERO DE PACIENTES CON CANDIDOSIS SISTÉMICA.

Se empleó la prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto empleando los anticuerpos a las concentración que previamente se optimizaron (ver figura 2).

La identificación se realizó a cuatro sueros de pacientes los cuales eran sospechosos a candidosis sistémica, con la finalidad de comprobar la prueba de ELISA se realizó hemocultivo a cada paciente, además de emplear un suero de humano normal como control (-), el reactivo de referencia de la enzima Enolasa de *S. cerevisiae* como control (+) y la enzima semipurificada de *C. albicans*; todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

1.- Se colocaron en cada pozo de la placa de ELISA 50 µl de cada una de las muestras séricas, enzima control y semipurificada, se incubó durante 1 hora a 37 C y se desechó el suero residual.

Figura 2: Placa de ELISA.



Tablero empleado para la optimización de los anticuerpos empleados en la prueba de ELISA; así como en la prueba de ELISA de tipo indirecto.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 PUREZA DE LA CEPA DE REFERENCIA DE *Candida albicans* ATCC 10232.

Después de la identificación de la cepa de referencia de *C. albicans* se confirmó que se encontraba sin contaminación alguna, mostrando los siguientes resultados en cada prueba:

a) Células levaduriformes teñidas como Gram positivas. b) En la prueba de tubo germinativo se observa la presencia de filamentos cortos denominados "tubos germinales". c) Presencia de estructuras esféricas y refringentes denominadas "clamidosporas". d) Tolerancia a pH ácidos (1.1, 1.3, 1.5) con enturbiamiento del respectivo medio de cultivo lo que indica el desarrollo de la levadura. e) Auxonograma: Se determinó que la cepa en esta prueba asimila los carbohidratos Glucosa, Galactosa y Maltosa, en donde se observa crecimiento alrededor de cada sensidisco. f) Zimograma: La cepa fermenta los carbohidratos Glucosa, Galactosa y Maltosa y se observa el cambio de color del indicador, de rojo a amarillo, además de la producción de gas.

Los resultados anteriores se presentan en el cuadro 2 donde se muestran también los del control negativo que fue *C. krusei*

Cuadro 2: Pruebas de identificación de cepas de *C. albicans* y *C. krusei*.

importantes para establecer una identificación entre especies que conforman el género *Candida*, ya que cada una de ellas muestra comportamientos característicos.

8.2 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA .

8.2.1 tratamiento con vortex y sonicación.

A las biomásas obtenidas por ambos tratamientos se les realizó cuantificación de proteínas por el método de Bradford, obteniéndose los siguientes resultados:

Tratamiento con vortex: 1.29 mg/ml.

Tratamiento con sonicación: 1.39 mg/ml.

Como se observa, los resultados en cuanto a la concentración de proteínas son muy similares en ambos tratamientos; considerando que las cuantificaciones se realizaron por triplicado y el resultado que se muestra es un promedio de todas estas. En 1990 Franklyn y colaboradores realizaron el mismo método de obtención de la enzima Enolasa por el tratamiento de vortex y en 1991 Zoller propone el tratamiento de sonicación; sin embargo, ninguno de ellos reporta resultados en cuanto a cuantificación de proteínas; por otro lado, en 1997 Montes de Oca y colaboradores realizan ambas metodologías y sus resultados son los mismos, debido a que no se cuenta con datos previos, en cuanto a los tratamientos empleados en este trabajo para se consideran óptimos para la obtención de la enzima Enolasa.

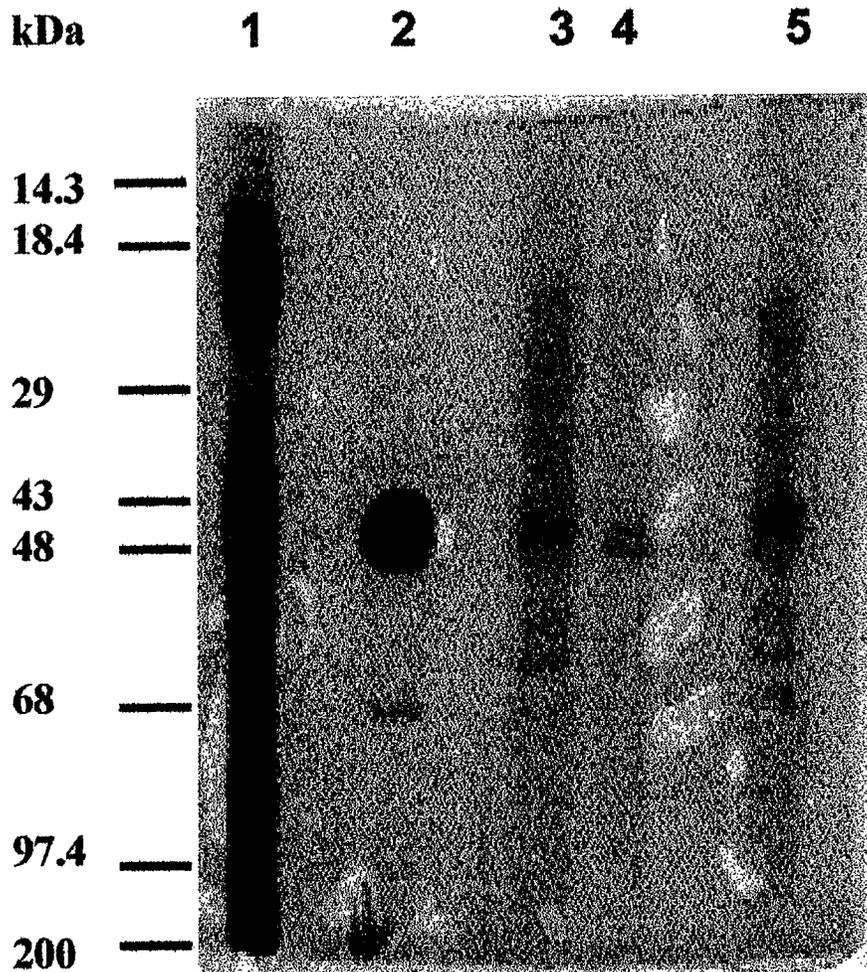
Comparando los resultados en la cuantificación de proteínas obtenidos en ambos tratamientos anteriores se optó por realizar el tratamiento con vortex por ser de fácil realización y emplear menos reactivos y material de laboratorio.

8.3 IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA A PARTIR DE LAS BIOMASAS MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

La figura 3 y 4 muestran los patrones electroforéticos obtenidos de las biomásas de los tratamientos con sonicación y vortex, en donde se observa una gran diversidad de proteínas constitutivas de *C. albicans* resaltando la presencia de una proteína de 48 kDa la cual es común en ambos extractos, la determinación de éste parámetro se realizó mediante el cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de la banda protéica e interpolando en la curva estándar de marcadores de peso molecular (ver figura 5). Al relacionar los resultados del corrimiento electroforético de los marcadores de peso molecular y por otro lado la banda que representa a la enzima Enolasa 4.2.1.11 de *S. cerevisiae* usada como control positivo, se comprueba que la banda indicada corresponde a la enzima Enolasa con un peso molecular de 48 kDa.

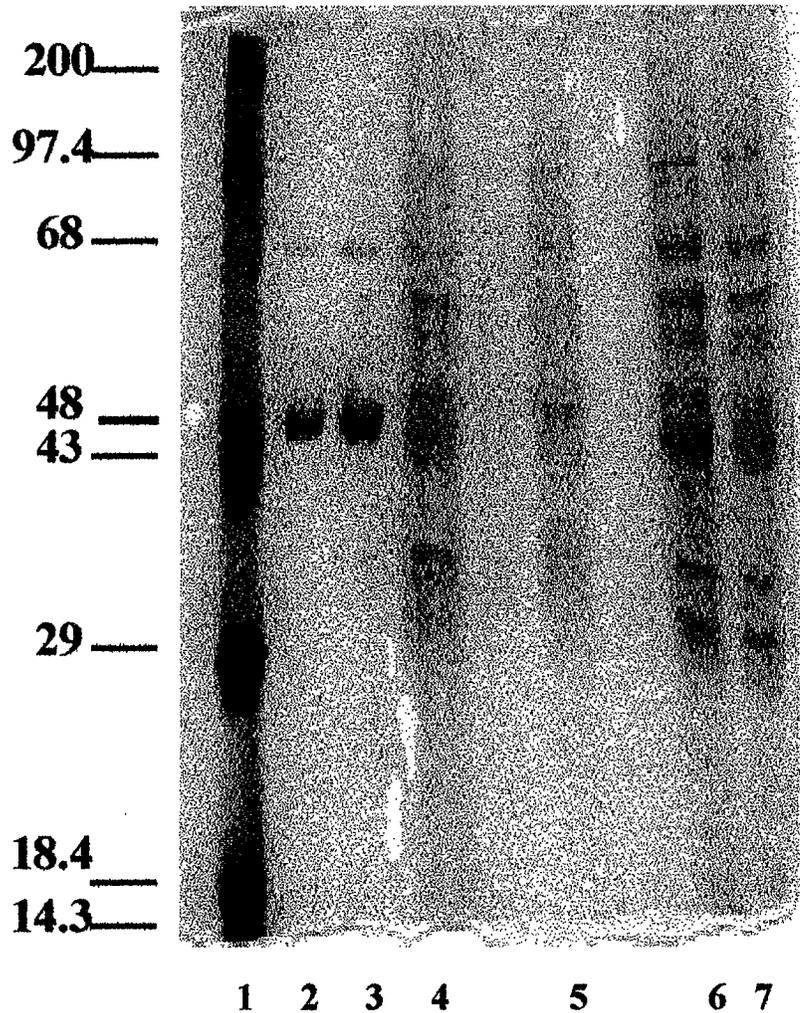
Por otro lado, se observa que tanto el tratamiento con vortex propuesto por Franklyn en 1990 como el de sonicación propuesto por Zoller en 1991 empleados en la obtención de la enzima Enolasa son eficaces, sin embargo se optó por realizar el primero, debido a que el tiempo empleado en la realización es menor, lo cual facilita obtención de la enzima.

Figura 3: Gel de poliacrilamida mostrando a la enzima Enolasa de *Candida albicans*.



- 1 = Marcadores de peso molecular.**
- 2 = Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cerevisiae*.**
- 3 = Células completas de *Candida albicans*.**
- 4 = Extracto crudo de Tratamiento con vortex.**
- 5 = Extracto crudo de Tratamiento con sonicación.**

Figura 4: Gel de poliacrilamida 10% mostrando a la enzima Enolasa en diversas muestras.



1= Marcadores de peso molecular.

2 , 3 = Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cerevisiae*.

4 , 5 = Extracto crudo de Tratamiento con vortex.

6 , 7 = Extracto crudo de Tratamiento con sonicación.

log PM

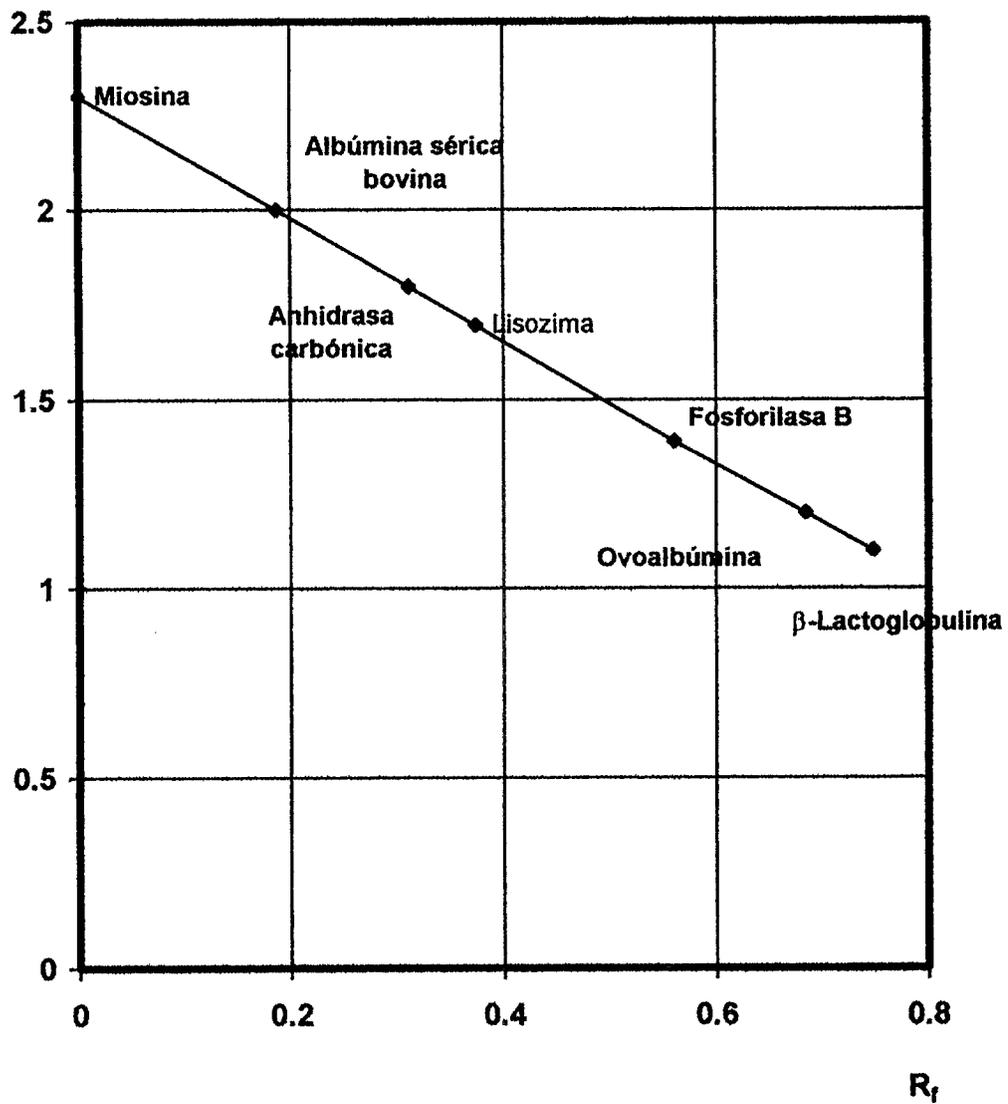


Figura 5. CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

8.4 TITULACIÓN DE LOS SUEROS HIPERINMUNES ANTI-ENOLASA.

Las titulaciones de los sueros se realizaron por la prueba de Dot-ELISA.

8.4.1 En ratón.

Día 20: Positivo 1:128.

8.4.2 En conejo.

Día cero: Negativo.

Día 30: Positivo 1:1024.

Día 46: Positivo 1:2048. Toma de muestra por punción cardíaca.

8.5 SEMIPURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *C. albicans* MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

A las biomasas obtenidas después de ser precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dializadas, pasadas a través de las columna de Sephadex G 100-120 en un caso y por otro en Sephadex G-25 y determinando a cada fracción la concentración de proteínas mediante el registro de sus lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm (ver gráfica 5 y 6). En la gráfica 5, donde se empleó el Sephadex G 100-120 se observa que el fraccionamiento de proteínas no es adecuado, ya que únicamente se observa un solo pico en las lecturas de absorbancia de la curva lo que indica que la purificación no fue satisfactoria; sin embargo, al analizar la curva obtenida con el Sephadex G 25 esta presenta lecturas muy variadas de absorbancia, con lo cual se determina que el fraccionamiento de las proteínas presentes en el precipitado

obtenido a partir de las células de *C. albicans* es más satisfactorio que con la otra columna cromatográfica.

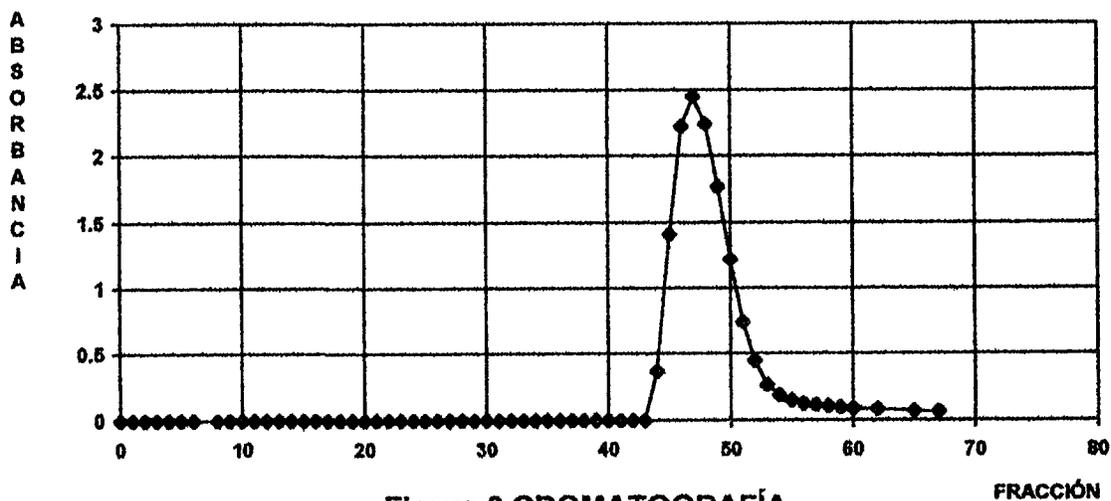


Figura 6. CROMATOGRFÍA
SEPHADEX G 100-120

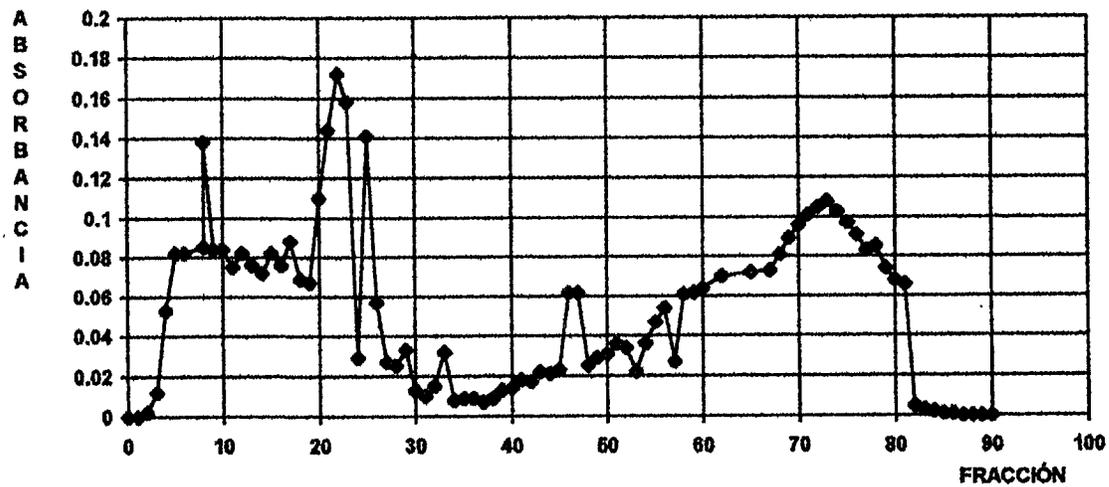


Figura 7. CROMATOGRFÍA
SEPHADEX G 25

En lo que respecta a las precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se puede observar en el cuadro 3 que conforme se realiza cada precipitación va disminuyendo tanto la concentración de proteínas como la actividad enzimática, lo anterior se puede relacionar en el corrimiento electroforético (ver figura 8), en donde se observa las bandas protéicas van eliminándose al realizar las precipitaciones; sin embargo, permanece presente la banda protéica con un peso molecular de 48 kDa.

Cuadro 3: Determinación de la actividad enzimática y cuantificación de proteínas de las precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la enzima Enolasa de *C. albicans*.

MUESTRA	PROTEÍNAS $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR UNIDAD ($\mu\text{mol}/\text{minuto}/10\mu\text{l}$)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL (μmol de producto formado/minuto/2ml)
CONTROL POSITIVO	5.00	0.895	-----
1er. SOBRENADANTE SOLUCIÓN	78.73	0.140	28.0
SATURADA $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
2º. SOBRENADANTE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 67%	73.36	0.113	22.6
3er. SOBRENADANTE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 33%	54.18	0.102	20.4
BIOMASA DIALIZADA	51.13	0.100	20.0

Se realizó la agrupación de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de las dos columnas cromatográficas a las cuales se les realizaron diversas pruebas que ayudaron a comprobar la presencia de la enzima Enolasa.

En la cromatografía de Sephadex G 100-120 al realizar la cuantificación de proteínas y determinación de actividad enzimática (ver cuadro4) se observa que al

disminuir la cantidad de proteínas disminuye también la actividad enzimática, permaneciendo constante la banda protéica de 48 kDa.

Cuadro 4: Fracciones cromatográficas de la biomasa que presentaron mayor concentración de proteínas totales, Sephadex G 100-120.

FRACCIÓN	PROTEINAS ($\mu\text{g}/100 \mu$)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol de producto formado/minuto}/10\mu\text{l}$)
MARCADORES DE PESO MOLECULAR CONTROL POSITIVO	0.00	0.00
FRACCIONES (1-5)	5.00	0.895
FRACCIONES (6-10)	87.94	0.180
	43.24	0.030

Al relacionar los resultados anteriores con el corrimiento electroforético se determina que en las fracciones cromatográficas 44-51 se eluye el total de las proteínas presentes en el extracto, por lo que la separación protéica no es satisfactoria.

En el caso de la cromatografía en Sephadex G 25 se realizó la prueba de actividad enzimática (ver cuadro 5) y corrimiento electroforético tiñendo con AgNO_3 en donde se observa que el pico que representa a la fracción cromatográfica 20-26 presenta un valor mayor de actividad enzimática de $0.116 \mu\text{mol de producto formado/minuto}/10\mu\text{l}$, el cual es el mayor en esta separación cromatográfica; lo anterior también se puede comprobar en el gel cromatográfico en donde esta fracción presenta la banda más clara y separada que en los carriles sobrantes; lo anterior se es un parámetro importante de purificación enzimática.

Cuadro 5: Fracciones cromatográficas de la biomasa que presentaron mayor concentración de proteínas, Sephadex G 25 .

FRACCIONES	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (μmol de producto formado/minuto/10 μl)
CONTROL POSITIVO	0.895
FRACCIÓN (4-10)	0.028
FRACCIÓN (20-26)	0.116
FRACCIÓN (46-48)	0.050
FRACCIÓN (54-57)	0.022
FRACCIÓN (65-70)	0.018

Respecto a la actividad antigénica únicamente se observa reconocimiento antigénico entre la enzima semipurificada y los antisueros anti-Enolasa de ratón y conejo así como con la enzima Enolasa control de *S. cerevisiae*, lo cual es un indicio de que la banda presente en la electroforesis y que posteriormente se transfirió al papel de nitrocelulosa en verdad es de la enzima Enolasa ya que de lo contrario no se observaría ninguna banda de reconocimiento pues los antisueros empleados tanto de ratón como de conejo son específicos para la enzima (ver Figura 12).

Los resultados anteriores dan un indicio de que la metodología propuesta en este trabajo para realizar la semipurificación de la enzima Enolasa de *C. albicans* es aceptable, sin embargo es importante considerar que al comparar las figuras 4 y 5 se observa una diferencia muy marcada en cuanto la separación de proteínas, por lo cual se sugiere que para trabajos posteriores de purificación de esta enzima se emplee Sephadex G 25, además de otras metodologías, las cuales ayuden a la purificación completa de esta enzima, y realizar pruebas complementarias que confirmen la purificación.

Al comparar los resultados de ambas columnas cromatográficas con lo que realizó Deventer et al., en 1994, en donde emplean Sephadex G 25, realizan precipitaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ además de emplear columnas cromatográficas de alta afinidad y los resultados en cuanto a la purificación de la enzima Enolasa es mayor ya que el empleo de este tipo de metodologías asegura una mayor purificación, aunado a lo anterior ellos logran obtener datos en cuanto al rendimiento reportandolo como 5 mg de enzima Enolasa pura de *C. albicans* a partir de 2 Lt de medio de cultivo, parámetro que en esta trabajo no se logró realizar ya que las cantidades que se obtuvieron fueron muy pequeñas y no era parte del objetivo principal de este proyecto.

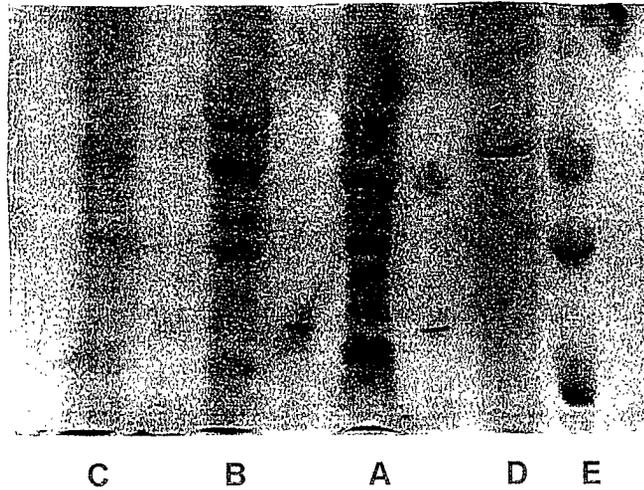


Figura 8: RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS DE LAS PRECIPITACIONES CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA BIOMASA OBTENIDA EN EL TRATAMIENTO CON VORTEX DE LAS LEVADURAS DE *Candida albicans*.

A: Biomasa dializada. **B:** Segundo sobrenadante, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 67%. **C:** Primer sobrenadante, solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **D:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae*. **E:** Marcadores de peso molecular.

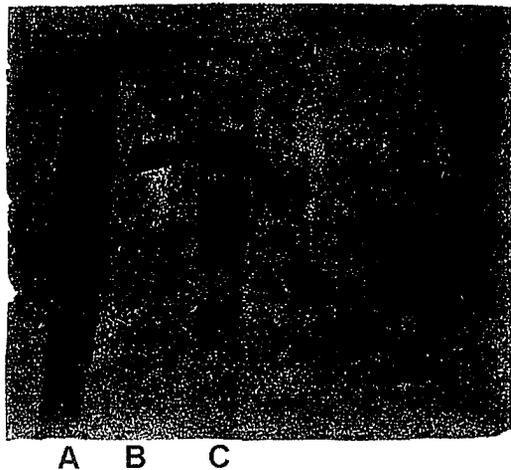


Figura 9: RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS DE LA CROMATOGRAFÍA EMPLEADA EN LA SEMIPURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *Candida albicans* EN COLUMNA DE SEPHADEX G 100-120.

A: Marcadores de peso molecular. **B:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae*. **C:** Fracciones cromatográficas 44-51.

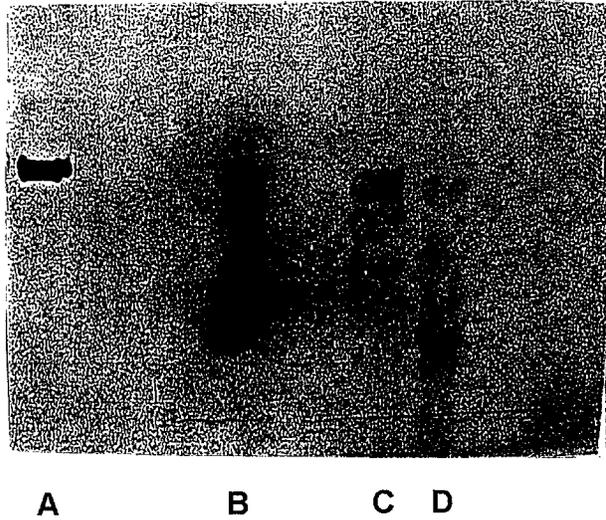


Figura 10: RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS DE LA SEMIPURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA *Candida albicans* EN COLUMNA DE SEPHADEX G 25.

A: Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae*. **B:** Fracción cromatográfica 4-10 **C:** Fracción cromatográfica 20-26 **D:** Fracción cromatográfica 46-48.

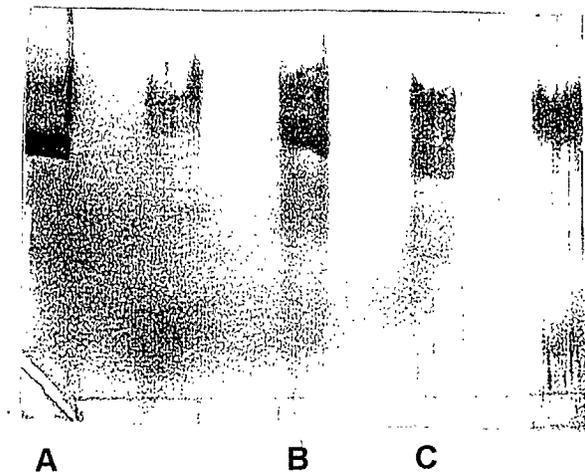
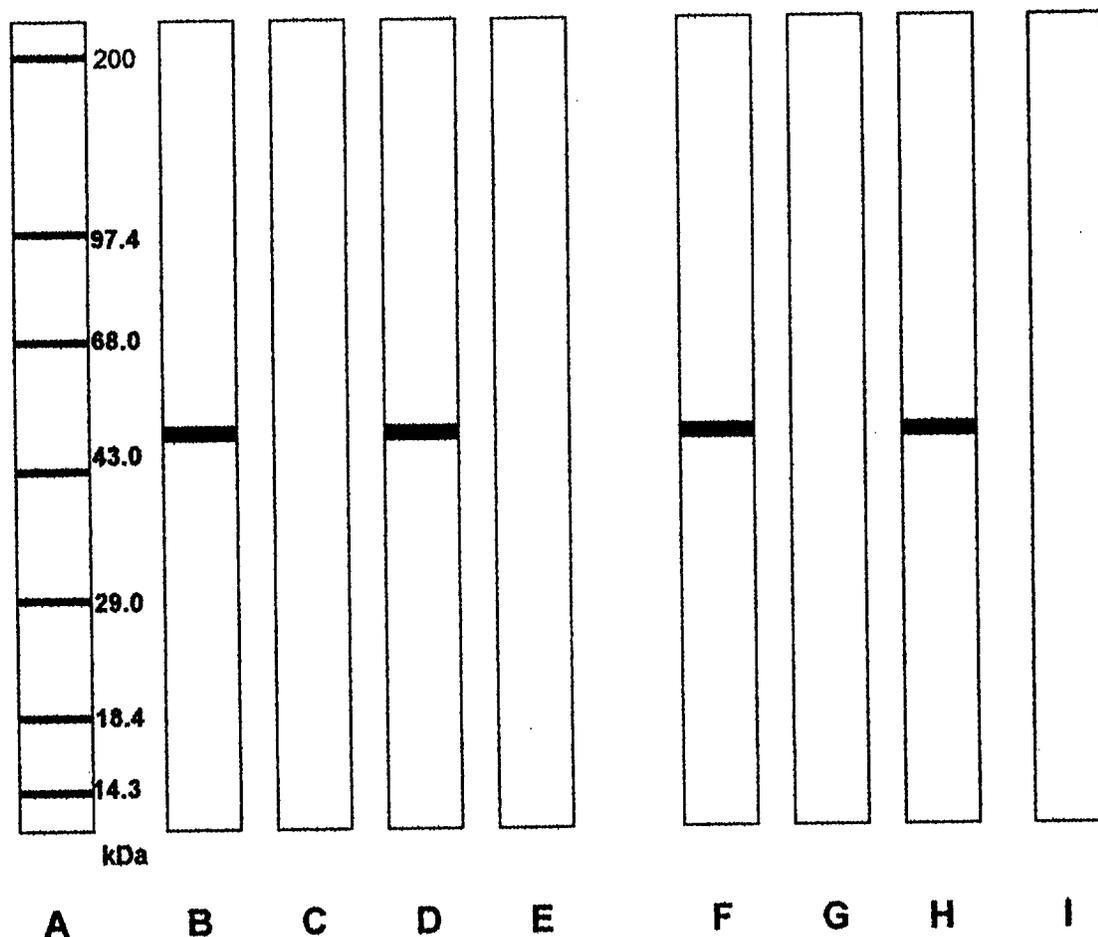


Figura 11: RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS DE LA SEMIPURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *Candida albicans* EN COLUMNA DE SEPHADEX G 25.

A: Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae*. **B:** Fracciones cromatográficas 54-57 **C:** Fracciones cromatográficas 65-70.

Figura 12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIGÉNICA DE LA ENZIMA ENOLASA (CONTROL DE REFERENCIA Y SEMIPURIFICADA) DE *Candida albicans* CON LOS SUEROS HIPERINMUNES ANTI-ENOLASA DE RATÓN Y CONEJO.



A: Marcadores de peso molecular teñidos con negro de amido. **B:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae* vs Suero hiperinmune anti-Enolasa de conejo. **C:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae* vs Suero negativo de conejo. **D:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae* vs Suero positivo anti-Enolasa de ratón. **E:** Control de referencia de la enzima Enolasa de *S. cereviceae* vs Suero de ratón negativo. **F:** Enzima Enolasa semipurificada de *C. albicans* vs Suero hiperinmune anti-Enolasa de conejo. **G:** Enzima Enolasa semipurificada de *C. albicans* vs Suero negativo de conejo. **H:** Enzima Enolasa semipurificada de *C. albicans* vs Suero hiperinmune anti-Enolasa de ratón. **I:** Enzima Enolasa semipurificada de *C. albicans* vs Suero negativo de ratón.

8.6 PRUEBA DIAGNÓSTICA DE ELISA DE TIPO INDIRECTO.

Tanto los volúmenes como concentraciones óptimas de las soluciones que se emplearon en la prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto para la identificación de la enzima Enolasa de *C. albicans* en el suero de pacientes con candidosis sistémica se muestran en el cuadro 6, estos valores son el promedio de tres determinaciones, así como de los anticuerpos, lo cual es importante considerar para posteriores determinaciones, ya que con esto se logrará obtener óptimos resultados.

Cuadro 6: Concentraciones y volúmen óptimo de soluciones necesarias en la prueba de ELISA.

VARIABLES	CONCENTRACIÓN	VOLÚMEN μ l
Solución de cubierta (ver apéndice I)	10 μ g/ml	100
Albúmina sérica bovina (ver apéndice I)	10 μ g/ml	100
Enzima Enolasa (antígeno) (ver apéndice I)	2.5 μ g/ml	50
Anticuerpo de ratón anti-Enolasa (ver apéndice I)	Dilución 1:64	50
Anticuerpo anti-ratón marcado con Peroxidasa (ver apéndice I)	100 μ g/ml, Dilución 1:8	50

La curva estándar para la cuantificación de la enzima Enolasa se muestra en la figura 13, esta gráfica ayudo a determinar la concentración de esta enzima presente en el suero de cuatro pacientes sospechosos a candidosis sistémica causada por levaduras de *C. albicans*. De los sueros antes mencionados tres presentaban la enzima Enolasa, el cuarto no, estos resultados se discutirán más adelante.

ABSORBANCIA.

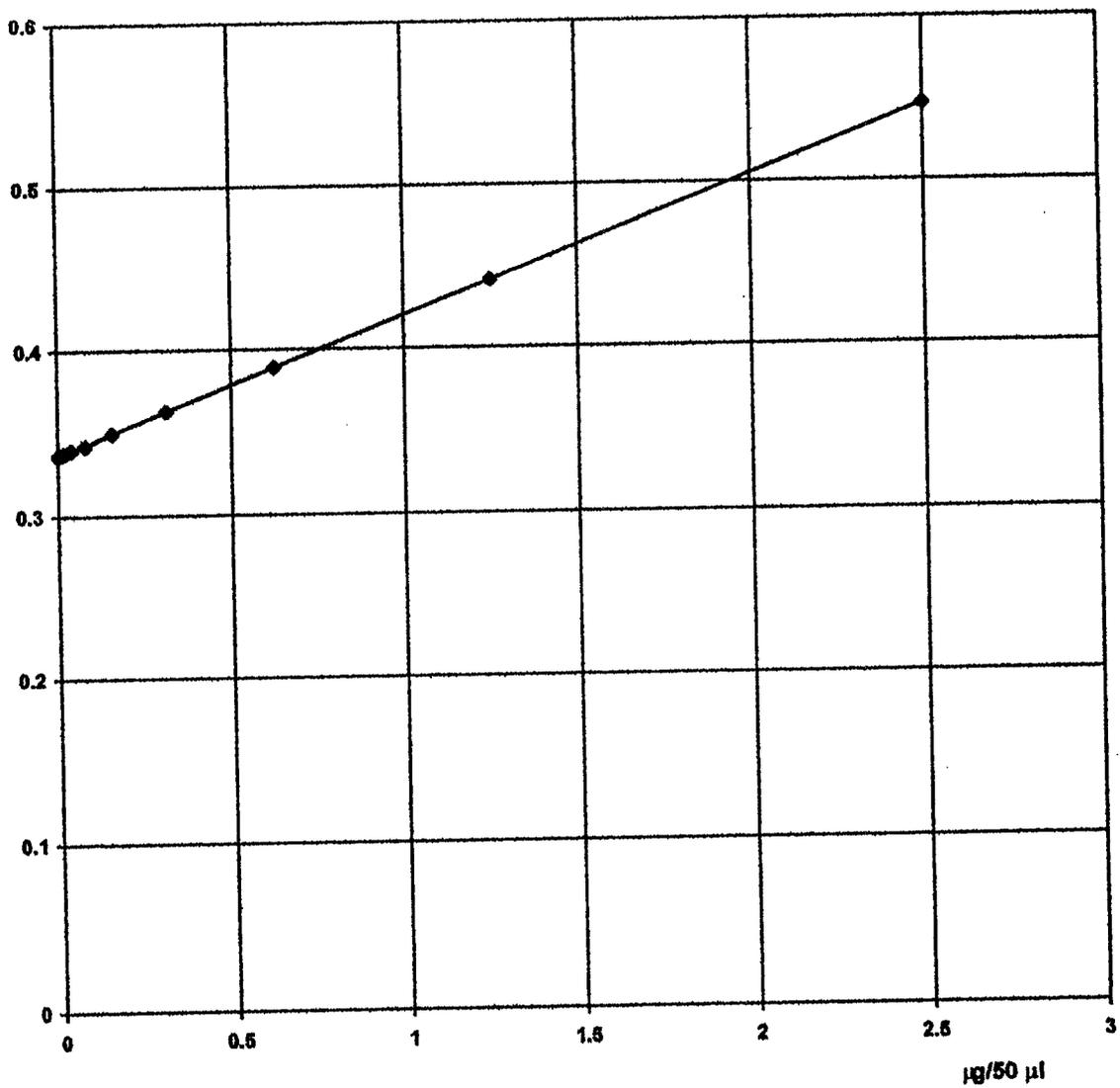


Figura 13. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *C. albicans* EN MUESTRAS SÉRICAS

La introducción de la prueba diagnóstica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) como una técnica sensible tanto para la identificación como cuantificación de anticuerpos y antígenos fúngicos es muy viable. Las ventajas que la prueba de ELISA sobre pruebas serodiagnósticas existentes en micología médica incluyen el empleo de punto final así como también la rapidez de la prueba; por otro lado, el equipo necesario para la realización de ésta prueba es simple y accesible.

Diversas investigaciones describen la aplicación de la prueba de ELISA de tipo indirecto en la detección de anticuerpos somáticos o antígenos metabólicos de *C. albicans* en donde se ha encontrado una correlación aceptable entre ésta prueba y otras pruebas serológicas en donde los antígenos que se han empleado son similares. Por otro lado, los métodos de aglutinación y precipitación que se han establecido fallan en distinguir entre pacientes con infecciones superficiales o profundas, en el caso de la prueba de ELISA para la detección de la enzima Enolasa si es posible identificar si se trata de una infección sistémica o localizada (Richardson, et al., 1983).

8.7 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA ENOLASA DE *C. albicans* EN EL SUERO DE PACIENTES CON CANDIDOSIS SISTÉMICA.

Los resultados de la cuantificación son los que se muestran en el cuadro 7 en donde se indica el promedio de las determinaciones realizadas por triplicado a cada muestra.

Cuadro 7: Cuantificación de la enzima Enolasa de *C. albicans* en el suero de pacientes con probable candidosis sistémica.

PACIENTE	ABSORBAN CIA	µg DE ENZIMA ENOLASA/50 µl	DIAGNÓSTICO	AISLAMIENTO HEMOCULTIVO
Niño (7 años de edad)	0.470	1.577	Candidosis sistémica	<i>Candida albicans</i>
Niño (3 años de edad)	0.450	1.349	Candidosis sistémica	<i>Candida albicans</i>
Adulto (38 años de edad)	0.321	0.605	Candidosis sistémica	<i>Candida albicans</i>
Adulto (37 años de edad)	0.000	0.000	Cryptococosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Control (+) Enzima Enolasa de <i>S. cerevisiae</i> (E.C.4.2.1.11.)	0.540	1.94	_____	_____
Adulto (23 años) Control (-)	0.000	0.000	Negativo a candidosis sistémica	Negativo
Enzima Enolasa de <i>C. albicans</i> semipurificada	0.493	1.86	Semipurificación	No aislamiento

Las muestras séricas probadas de los pacientes sospechosos de candidosis sistémica se diagnosticaron como positivos a *C. albicans* excepto el suero No. 4 ya que en éste no se detectó enzima Enolasa, siendo el resultado de hemocultivo un aislamiento de *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*); lo anterior es muy importante ya que la levadura de *C. neoformans* podría ser causa de obtener resultados falsos positivos lo que no sucedió en ésta prueba por lo cual se elimina un factor importante que pudiera alterar los resultados.

A los pacientes sospechosos también se realizó su aislamiento en hemocultivo en donde se aisló e identificó a *C. albicans* en tres de los sueros, a partir de las

colonias aisladas se les realizó tinción de Gram en donde se observan células ovoides teñidas como Gram positivas además de realizar la prueba de tubo germinativo siendo este positivo, el auxonograma presento resultados positivos en el caso de Glucosa, Galactosa y Maltosa para el zimograma fueron positivos únicamente a Glucosa y negativos para Galactosa y Maltosa; también se observó crecimiento a pH ácido. Las pruebas anteriores confirman el diagnóstico de candidosis sistémica causada por *C. albicans*. El hemocultivo del cuarto paciente presenta en su aislamiento *Cryptococcus neoformans*, se realizó la tinción con tinta china, observandose células redondas y rodeadas por una cápsula, por lo cual éste paciente se diagnostico con criptococosis.

El suero control (-) no presentó ningún aislamiento tanto micológico como bacteriano, ya que se trata de un paciente sano.

Por otro lado, se observa que la muestra de la enzima Enolasa purificada muestra un valor similar al del control positivo que es la enzima Enolasa de *S. cerevisiae*.

9. CONCLUSIONES

Se logró realizar la semipurificación de la enzima Enolasa de *Candida albicans* empleando una metodología más rápida y sencilla que la que anteriormente era propuesta; sin embargo, es importante considerar que de los dos tipos de Sephadex empleados en los corrimientos cromatográficos el que mostró buenos resultados fue el G 25 ya que como se menciona en el apartado de resultados mostro una aceptable separación de proteínas, por otro lado es importante el considerar que la finalidad de este trabajo no era el obtener la enzima Enolasa de *C. albicans* en grandes cantidades ya que de ser así se tendría que proporcionar datos de rendimiento; sin embargo, para cuestiones de este trabajo únicamente se requería la enzima lo más pura posible y en cantidades que permitieran el desarrollo de la prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto lo cual sí se logró realizar.

Por lo anterior se observa que el método propuesto en este trabajo facilita la semipurificación de esta enzima ya que los resultados en cuanto a corrimiento electroforético, actividad enzimática y antigénica lo confirman.

La prueba diagnóstica de ELISA de tipo indirecto empleada para la identificación y cuantificación de la enzima Enolasa de *Candida albicans* es de gran utilidad en el proceso de diagnóstico de una candidosis sistémica causada por *Candida albicans* ya que los resultados muestran gran confiabilidad, pues concuerdan con el hemocultivo el cual es un método tradicional de diagnóstico de esta enfermedad,

considerando que la rutina empleada para este tipo de diagnóstico resulta tardada es importante el considerar la prueba de ELISA propuesta en este trabajo, ya que su es aproximadamente de 5 horas y en el caso de aislamiento por hemocultivo puede tardar de 2 a 3 días.

Para un futuro resultará importante el llevar acabo la validación de la prueba de ELISA empleando una mayor cantidad de sueros, además de emplear muestras que presenten microorganismos que puedan interferir en la prueba y con esto se reporten resultados falsos positivos. Por lo cual es importante el considerar llevar acabo la estandarización de la prueba para lograr obtener la sensibilidad y especificidad requeridas y sea difundida a los laboratorios de diagnóstico clínico de diversos hospitales.

10. A P E N D I C E I

A. MEDIOS DE CULTIVO.

AGAR DEXTROSA SABOURAUD (SDA).

Mezcla de peptonas	10.0 gr.
Dextrosa	40.0 gr.
Agar	15.0 gr.
Agua destilada	1000.0 ml.

Suspender 65 gr. del medio de cultivo deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10-15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 C, 15 lb. durante 15 minutos.

AGAR CZAPEK-DOX MÁS TWEEN 80.

Agar Czapek-Dox	50.0 gr.
Tween 80 (Polisorbato)	10.0 ml.
Agua destilada	1000.0 ml.

Suspender 50 gr. del medio de cultivo deshidratado en 1 litro de agua destilada y mezclar; adicionar 10.0 ml. de Tween 80 y mezclar, calentar por 1 minuto. Esterilizar 121 C, 15 lb durante 15 minutos.

AGAR CORN MEAL MÁS TWEEN 80.

Agar Corn Meal	17.0 gr.
Tween 80	10.0 ml.
Agua destilada	1000.0 ml

Suspender 17.0 gr. del agar Corn Meal en 1 litro de agua destilada y disolverlo completamente. Esterilizar 121 C, 15lb durante 15 minutos.

CALDO EXTRACTO DE LEVADURA, PEPTONA Y DEXTROSA (YEPD).

Mezcla de peptonas	20.0 gr.
Dextrosa	20.0 gr.
Extracto de levadura	10.0 gr.
Agua destilada	1000.0 ml.

Suspender las cantidades antes mencionadas en 1 litro de agua destilada, calentar suavemente y agitar hasta disolver cada uno de los componentes. Esterilizar 121 C, 15 lb durante 15 minutos.

B. SOLUCIONES.

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA 0.85% (S.S.F.).

Cloruro de sodio	0.85 gr.
Agua destilada	100.00 ml.

AMORTIGUADOR DE LISIS.

PMSF (Metilsulfonilfluorido)	1 mM
β -mercaptoetanol	10 mM
EDTA	1 mM
PBS, pH 7.4	1000 ml.

C. SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA ELECTROFORESIS.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS) 0.1 M, pH 7.4

Solución A (Fosfato de sodio monobásico 0.2 M).

Disolver 27.6 gr. de Fosfato de sodio monobásico monohidratado, aforando a 1 litro de agua destilada.

Solución B (Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0.2 M).

Disolver 53.65 gr. de Fosfato de sodio monobásico heptahidratado, aforando a 1 litro de agua destilada.

Mezclar 95 ml. de la solución A más 405 ml. de la solución B y 500 ml. de agua destilada.

REACTIVO DE BRADFORD.

Azul brillante de Coomassie R-250	50 mg.
Etanol al 95%	25 ml.
Ácido o-fosfórico al 85%	50 ml.
Agua destilada aforando a	500 ml.

AMORTIGUADOR TRIS (HIDROXIMETILAMINOMETANO)-HCl 1.5M.

Tris-base	18.75 gr.
Agua destilada	80.00 ml.

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N, llevar a 100 ml. con agua destilada y almacenar a 4 C.

ACRILAMIDA-BIS (SOLUCIÓN STOCK 30%).

Acilamida	29.2 gr.
Bis-acrilamida	0.8 gr.

Llevar a 100 ml. con agua destilada, filtrar y almacenar a 4 C en frasco ambar.

PERSULFATO DE AMONIO 10%.

Persulfato de amonio	0.1%
Agua destilada	1.0 ml.

SDS 10%.

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10.0 gr.
Agua destilada	100.0 ml.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA STOCK DE CORRIDA PARA ELECTROFORESIS.

Tris-base	0.123 M
Glicina	0.960 M
SDS	0.017 M
Agua destilada	600.000 ml.

Almacenar a 4 C, calentar a 37 C antes de usar, si se forma algún precipitado diluir 60 ml. de solución con 240 ml. de agua destilada.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BUFFER MUESTRA.

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.0625 M
Glicerol	10.0 %
SDS	0.346 M
2-β-mercaptoetanol	0.716 M
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 ml.
Agua destilada	4.0 ml.

Diluir la muestra por lo menos a 1:4 con buffer muestra y calentar a 95 C durante 5 minutos.

SOLUCIÓN STOCK AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE R-250 1% .

Azul brillante de Coomassie R-250 1%	2.0 gr.
Agua destilada	200.0 ml.
Agitar y filtrar.	

SOLUCIÓN DE COOMASSIE PARA TINCIÓN DE GELES ELECTROFORÉTICOS.

Solución stock Azul de Coomassie R-250 1%	62.5 ml.
Metanol	250.0 ml.
Ácido acético	50.0 ml.
Aforar con agua destilada	500.0 ml.

SOLUCIÓN DESTENIDORA I PARA GELES ELECTROFORÉTICOS.

Metanol	125.0 ml.
Ácido acético	25.0 ml.
Aforar con agua destilada	250.0 ml.

SOLUCIÓN DESTENIDORA II PARA GELES ELECTROFORÉTICOS.

Metanol	12.5 ml.
Ácido acético	17.5 ml.
Aforar con agua destilada	250.0 ml.

SOLUCIÓN SALINA-TRIS 20 mM, TRIS-NaCl (TBS) pH 7.5.

Tris-base	4.84 gr.
Cloruro de sodio	58.48 gr.
Ajustar a pH 7.5 con HCl 1N	
Aforar con agua destilada	2000.00 ml.

D. SOLUCIONES EMPLEADAS EN INMUNOTRANSFERENCIA.

SOLUCIÓN BLOQUEADORA PARA TRANSFERENCIA.

Leche descremada en polvo	1.25 gr.
TBS	25.0 ml.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA CORRIDA DE TRANSFERENCIA.

Tris-base	0.025 M
Glicina	0.019 M
Metanol	20%
Disolver con agua destilada, ajustar a pH 8.3	
Aforar con agua destilada	1000.000 ml.

SOLUCIÓN REVELADORA.

SOLUCIÓN A:	
α -Cloronaftol	30.0 mg.
Metanol	10.0 ml.

SOLUCIÓN B:	
Solución A	5.0 ml.
TBS	25.0 ml.
Peróxido de hidrógeno 30%	25.0 μ l.

SOLUCIÓN NEGRO DE AMIDO.

Negro de amido	100.0 mg.
Metanol	44.0 ml.
Ácido acético	1.0 ml.
Agua destilada	45.0 ml.

SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 0.01% (ASB).

Albúmina sérica bovina	10.0 gr.
PBS pH 7.4	100.0 ml.

SOLUCIÓN "A" PARA TEÑIR GELES CON AgNO₃.

Nitrato de plata	0.8 gr.
Agua desionizada	4.0 ml.

SOLUCIÓN "B" PARA TEÑIR GELES CON AgNO₃.

Hidróxido de amonio 0.36%	21.0 ml.
Hidróxido de amonio 14.8 M.	1.4 ml.

SOLUCIÓN "C" (SOLUCIÓN TEÑIDORA) PARA TEÑIR GELES CON AgNO₃.

Añadir gota a gota la solución "A" en la solución "B", ésta debe usarse durante los cinco minutos siguientes.

SOLUCIÓN REVELADORA PARA TINCIÓN CON AgNO₃.

Ácido cítrico 1%	2.5 ml.
Formaldehído 38%	0.5 ml.
Agua desionizada	500.0 ml.

E. SOLUCIONES EMPLEADAS PARA DOT-ELISA Y ELISA.

SOLUCIÓN DE CUBIERTA

Carbonato de sodio	1.50 g.
Carbonato ácido de sodio	2.93 gr.
Agua desionizada	1000 ml.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

Solución de Albúmina sérica bovina	5.0 ml.
Agua desionizada	45.0 ml.

SOLUCIÓN DE LAVADO

PBS-Tween 20	0.05%
Cloruro de sodio	8.0 gr.
Fosfato diácido de potasio	0.2 gr.
Fosfato ácido de sodio	1.28 gr.
Cloruro de potasio	0.2 gr.
Tween 20	0.5 ml.
Agua desionizada	1000.0 ml.
Ajustar a pH= 7.4	

SUSTRATO DE LA ENZIMA.

Prepararlo antes de su uso.	
Sustrato de peroxidasa (ABTS)	5.0 ml.
Peroxidasa	5.0 ml.

SOLUCIÓN DE DETENCIÓN DE REACCIÓN.

Ácido sulfúrico 2.5 M.

11. BIBLIOGRAFIA

Agabian, N.; Odds, F.C.; Poulain, D.; Soll, D. and White, T.C.: (1994). Pathogenesis of invasive candidiasis. *Journal of Medical Veterinary Mycology*. 32, 229-237.

Arenas, R.: 1993. *Micología Médica Ilustrada*. 1a. Ed. Edit. Nueva Editorial Interamericana. p.223-233.

Ashman, R.B.; Papadimitio, J.M.; Ott, A.K.; Warmington, J.R.: (1990). Antigens and immune responses in *Candida albicans* infection. *Immunol. Cell Biol.* 68, 1-13.

Bailey, J.W.; Sada, E.; Brass, C. and Bennett, J.E.: (1985). Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 21 (5), 749-752.

Bennett, J.E.: (1987). Rapid Diagnosis of Candidiasis and Aspergillosis. *Rev. Infect. Dis.* 9, 398-402.

Bonifaz, A.: (1991). *Micología Médica Básica*. 1a. Ed. Edit. Méndez Cervantes. México. p. 277-300.

Boauli, A.; Robert, R.; Tronchin, G. and Senet, J.M.: (1987). Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tubes and mycelium of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 133, 545-551.

Bradford, M.: (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brawner, D.L. and Cutler, J.E.: (1989). Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised, patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *Journal Clin. Microbiol.* 27, 1020-1025.

Calderone, R.A.; Cihlar, R.L.; Lee, D.; Hoberg, K. and Scheld, W.H.: (1985). Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to *Candida albicans* studies with adherence-negative mutants. *Journal of Infectious Diseases*. 152, 710-715.

Campos, C.G.: (1991). Candidiasis vulvovaginal (Especies involucradas, correlación con signos y síntomas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México. UNAM.

Colowich, S.: (1955). *Methods in Enzymology* Y. 1st. Edit. Academic. New York. p. 427-435.

Critchley, I.A. and Douglas, L.T.: (1987). Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 133, 629-636.

Chaparro, R.J.: (1993). Estandarización de la prueba de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de antígeno circulante en infecciones por *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México, UNAM.

Dealler, S.F.: (1991). *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 29 (5), 1081-1082.

Deventer Van, A.J.M.; Vliet Van H.J.A.; Hop, W.C.J. and Goessens, W.H.F.: (1994). Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *Journal. Clinical Microbiology*. 32:17-23.

Dixon, M. and Webb, E.C.: (1979). *Enzymes*. 3rd. Ed. Edit. Academic Press. USA. p. 551-557.

Douglas, L.I.: (1987). Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *C.R.C.* 15 (1), 24-43.

Francois, M.; Drouhet, E.: (1996). Las levaduras de importancia médica y veterinaria. *Dermatología*. 40, 31-42.

Franklyn, K.M.; Warmington, J.R.; Ott, A.K. and Ashman, R.B.: (1990). An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol. Cell. Biol.* 68, 173-178.

Fung, J.C.; Donta, S.T. and Tilton, R.C.: (1986). *Candida* detection system (Cand-tec) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 24 (4) 542-547.

Gavilondo, C.J.: (1995). Anticuerpos monoclonales. Edit. Elfos. La Habana Cuba. 71,99.

Herrera, E.: (1993). Elementos de bioquímica. 1a. Ed. Edit. Interamericana-Mc Graw Hill, México. p. 370.

Holmes, A.N.; Canon, R.D.; Shepered, M.G.; Jenkinson, A.F.: (1994). Detection of *Candida albicans* and Other Yeast in Blood by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 228-231.

Kennedy, M.J.; Voltz, P.A.; Edwards, C.A. and Yancey, R.I.: (1987). Mechanism of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 23, 333-341.

Kennedy, M.J.; Calderone, R.A.; Cutler, J.E.; Kanabe, T.; Reiaaelman, M.H.; Robert, R.; Senet, I.M.; Annaix, V.; Bovali, A.; Mahaza, C.; Tronchin, G.; Bouchara, J.P.; Miegerville, M.; Marot-Lebrand, A. and Segal, E.: (1992). Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 30, 95-122.

Klotz, S.A.; Drutz, D.J.; Harrison, J.L. and Huppert, M.: (1983). Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeast. *Infect. Immun.* 42, 374-384.

Kohno, S.: (1996). Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen and β -Glucan antigen in patients with Candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 34:1918-1921.

Kotaro, M.; Takashige, M.; Takayoshi, T.; Yoshihiro, Y.; Hiroshi, K.; Takakazu, O.; Sumio, K.; Mohammad, A.; Tetsuhiro, N.; Yoichio H. and Shigeru, K.: (1996). Enolase antigen, mannan antigen, Cand-tec antigen and β -glucan in patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1918-1921.

Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E.: (1992). Medical Mycology. 1st. Edit. Edit. Lea and Febinger. USA. p. 280-326.

Krick, J.A.; Remington, J.S.: (1981). Oportunistic invasive fungal infections in patients with leukemia. *Clin. Hematol.* 5:249-310.

Laemmli, U.K.: (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London. 227:680-685.

Lee, K.W. and Balish, E.: (1983). Systemic candidiasis in silica-treated athymic and euthymic mice. *Infection and Immunity*. 41, 902-907.

Lemieux, C.; St. German, G.; Vincelette, J.; Kauffman, L. and Repentigny, L.: (1990). Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test an enzyme immunoasay in the diagnosis of invasive candidiasis. *Journal Clin Microbiol.* 28, 249-253.

McAlister, L.; Holland, M.J.: (1982). Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. *J. Biol. Chem.* 257, 7181-7188.

Matthews, R.C.; Burnie, J.P.: (1988). Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47 kDa antigen. *J. Clin. Microbiol.* 27:227-232.

Nugent, K.M. and Onofrio, J.M.: (1984). Pulmonary clearance of *Candida albicans* in neutropenic mice. *Journal Infect. Dis.* 149, 1020.

Odds, F.C.: (1979). *Candida* and Candidosis. Leicester University. Park Press. Baltimore, USA.

Phillips, P.; Dowd, A.; Jewesson, P.; Radigan, G.; Tweeddale, M.G.; Clarke, A.; Gere, I. and Kelly, M.: (1990). Nonvalue of antigenic detection immunoassays for diagnostic of candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2320-2326.

Richardson, M.D.; Warnock, D.W.: (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay and its application to the serological diagnosis of fungal infection. *Sabouraudia.* 21:1-14.

Salas, T.E.: (1995). Obtención de antígenos de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* para el desarrollo de pruebas diagnósticas. Tesis de Maestría, Área Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México. UNAM.

Sandford, G.R.; Mertz, W.G.; Wingard, J.R.; Charache, P. and Sarol, R.: (1980). The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J. Infect. Dis.* 142, 503-509.

Segundo, Z.C.: (1991). Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México. UNAM.

Sheperd, M.G.: (1985). Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect. Immun.* 50, 541-544.

Sundstrom, P.; Aliaga, R.G.: (1994). A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant immunodominant glycolytic enzyme enolase. *J. Infect. Dis.* 169: 452-456.

Strockbine, N.A.; Lagen, M.T.; Zweibel, M. S.; Buckley, H.R.: (1984). Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human sera. *Infect. and Immun.* 43: 715-721.

Towbin, H.: (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 76: 430-435.

Zoller, L.; Kramer, Y.; Kappe, R. and Sonntag, H.G.: (1991). Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections: reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 29:1860-1867.