



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**BIOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Candida albicans*
MEDIANTE LA TECNICA
DE 5- FLUOROCITOSINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
JUAN CARLOS JARAMILLO PEDROZA**

**ASESORES: Dra. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO
Dr. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2008



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 DIOS.

POR LA OPORTUNIDAD DE SER Y ESTAR...

A MIS PADRES

POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL...

A MI HERMANO

POR TU PRESENCIA, EJEMPLO Y COMPLICIDAD...

DEDICATORIAS.

A MIS ASESORES DE TESIS

Y PROFESORES DEL JURADO

Dra. ALMA NUÑEZ Y Dr. ENRIQUE SALAS

POR SU PACIENCIA, CONSEJOS Y CONOCIMIENTOS, POR SU TIEMPO DEDICADO A LA REVISIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE ESTE TRABAJO, POR SU AYUDA DESINTERESADA, POR LA CONFIANZA QUE HAN TENIDO EN MI Y POR SU AMISTAD PRESENTE EN TODO MOMENTO.

MVZ. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ

QFB. JUAN CHIU CHAN

Dra. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

MC. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

GRACIAS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE FORMAR PARTE DE LA MAXIMA CASA DE ESTUDIOS, POR SER, MI. "ALMA MATER", POR EL ORGULLO DE SER UNIVERSITARIO Y POR QUE GRACIAS A ELLA.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

POR FORMARME COMO UNIVERSITARIO DENTRO DE SUS AULAS, POR COMPARTIR CON SU ESPACIO Y TIEMPO LA ETAPA MAS IMPORTANTE DE MI EDUCACION, PORQUE AHI ADQUIRÍ EL CONOCIMIENTO Y LA FORMACION QUE MAS ADELANTE SERIA LA HERRAMIENTA PRINCIPAL DE MI DESEMPEÑO PROFESIONAL. GRACIAS POR LA OPORTUNIDAD DE SER:

"DE SANGRE AZÚL Y PIEL DORADA"

DEDICATORIAS.

A MI ESPOSA.

*CON AMOR, A TI **CARMEN**, POR LOS BELLOS MOMENTOS QUE PERMITES COMPARTAMOS JUNTOS.*

TE AMO.

*A TI **JUAN CARLOS** POR QUE TU ALEGRIA Y LA SONRISA CON QUE AFRONTAS LA VIDA ES LA FUERZA QUE ME AYUDA PARA SEGUIR ADELANTE, ESTE Y TODOS MIS LOGROS DESEO COMPARTIRLOS CONTIGO HIJO. QUE ESTE SUEÑO HECHO REALIDAD FORME EN TI LA AMBICION Y LAS GANAS DE SER "UNIVERSITARIO."*

TE AMO HIJO.

SI ESTAN AL FINAL NO ES QUE SIGNIFIQUE QUE SEAN MENOS, SIMPLEMENTE QUISE DEJAR AL FINAL LO MEJOR. Y LA MEJOR FORMA DE EXPRESARLES LO QUE SIENTO ES DICIENDOLES

LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS.

CUANTAS COSAS BELLAS PUDIERA DECIRTE PARA EXPRESARTE MI AGRADECIMIENTO POR HABERME PERMITIDO LLEGAR HOY HASTA ESTE MOMENTO TAN IMPORTANTE EN MI VIDA, MAS SIN EMBARGO, TODO LO QUE PUDIERA DECIR SEGURAMENTE NO ALCANZARIA PARA PLASMAR CON PALABRAS MI SENTIR HACIA TI, TÚ QUE ME CONOCES DESDE QUE YO AÚN NO EXISTIA, SABES LO QUE HAY EN MI CORAZON PARA TI.

GRACIAS SEÑOR.

A MIS PADRES

GRACIELA PEDROZA ARANDA

EL PRIMER AMOR QUE CONOCI FUE EL TUYO, QUIZA EL MAS GRANDE Y DESINTERESADO QUE PUEDA LLEGAR A TENER. MAMÁ, QUIERO DARTE LAS GRACIAS POR TU ENTREGA, DEDICACION Y TERNURA, POR TODOS TUS CUIDADOS Y DESVELOS QUE ME HAS DADO DURANTE TODA MI VIDA.

POR TODO TU AMOR. GRACIAS MAMÁ.

CARLOS JARAMILLO GÓMEZ

TU CONFIANZA IMPREGNADA DE AMOR, TU CARIÑO COMPLACIENTE QUE SE CONVIRTIÓ EN MI LIBERTAD DE SER, TU EJEMPLO DE FUERZA, ASI COMO TODOS LOS SACRIFICIOS QUE HAS TENIDO PARA DARME LO QUE NECESITÉ, HAN SIDO LA GUIA DE MIS PASOS, FORMACION DE MI CARACTER Y PILAR DE MI EDUCACION.

TE QUIERO MUCHO. GRACIAS PAPÁ.

A MI HERMANO.

RICARDO ALI JARAMILLO PEDROZA

A QUE GRANDE BENDICION ME HE HECHO MEREDEDOR AL TENERTE COMO HERMANO, TU QUE HAS SIDO EL MEJOR "AMIGO" QUE HE LLEGADO A TENER, TU CARIÑO Y COMPLICIDAD, Y EL SABER QUE SIEMPRE VAS A ESTAR A MI LADO APOYANDOME ME HAN AYUDADO A CULMINAR ESTE SUEÑO.

HERMANO, GRACIAS POR LOS GRANDES MOMENTOS DE FELICIDAD QUE HEMOS COMPARTIDO JUNTOS.

GRACIAS RICHARD.

AGRADECIMIENTOS.

A MIS AMIGOS DE LA CARRERA.

PAOLA GODINEZ, MARIBEL HERNANDEZ, BLANCA CALDERON, VERONICA MARQUEZ, VERONICA ALMAZAN, JUANITA GUERRERO, MARCO A. RODRIGUEZ, FERNANDO REYES, ODIN PADILLA, JESUS CANALES, ALEJANDRO CORTES, POR QUE CON ELLOS COMPARTÍ MOMENTOS INOLVIDABLES Y CUYAS ANECDOTAS ENRIQUECEN MI VIDA CADA VEZ QUE LAS RECUERDO.

A MIS AMIGOS

ANGEL RUIZ, ALINKA HUCHIN, ALVARO PÉREZ, DIANA ESPINOSA, FIDENCIO GONZÁLEZ, MATEO VAZQUEZ, FRANCISCO FERNÁNDEZ, FRANCISCO GONZÁLEZ, AMAURI ESQUIVEL, QUIENES DE UNA U OTRA MANERA HAN ESTADO PRESENTES EN MI VIDA IMPULSANDOME, CREYENDO EN MI Y APOYANDOME.

GRACIAS AMIGOS

AL QFB. FELIPE NAVARRETE CARO.

QUIEN DURANTE EL INICIO DE MI TRABAJO PROFESIONAL ME APOYO CON SUS CONSEJOS Y DIRECCION, Y ACTUALMENTE VUELVE A MOSTRARSE EN ESTA NUEVA ETAPA DE MI VIDA LABORAL APOYANDOME Y ALENTANDOME PARA SER MEJOR DIA A DIA. POR TU PROFESIONALISMO Y AMISTAD.

GRACIAS FELIPE.

INDICE

	PAGINAS
1 INTRODUCCION	5
1.1 Marco histórico	5
1.2 Estudios iniciales	5
1.3 Justificación	8
1.4 Hipótesis	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos particulares	10
2.3 Generalidades de <i>Candida albicans</i>	11
2.4 Candidiasis	11
2.5 Taxonomía	12
2.6 Características de <i>Candida albicans</i>	12
2.7 Clasificación de candidiasis	19
2.7.1 Candidiasis de las mucosas	20
a) La infección bucal	20
b) Glositis crónica	20
c) Lengua vellosa	20
d) Boqueras	20
e) Vulvovaginitis	20
2.7.2 Candidiasis cutánea	22
a) Oniquia y Paroniquia	22
b) Intertrigo	22
c) Candidiasis perianal	22
2.7.3 Candidiasis generalizada	23
a) Candidiasis broncopulmonar	23
b) Candidiasis pulmonar	23
c) Alérgicas	23
2.8 Antecedentes de la biotipificación de <i>Candida albicans</i>	24
2.9 Estructura antigénica de <i>Candida albicans</i>	28
2.10 Patogénesis de la candidiasis	31
2.11 Incidencia e importancia a nivel mundial	33
a) Aumento en la incidencia de candidiasis	33

2.12 Antecedentes de la 5-Fluorocitosina	36
2.13 Farmacodinamia de la 5-Fluorocitosina	37
2.14 Técnicas empleadas en la biotipificación	39
2.15 Sensibilidad de <i>Candida albicans</i> a agentes antifúngicos	41
2.16 Diagrama metodológico	44
3 MATERIALES Y METODOLOGIA	45
3.1 Muestras colectadas	45
3.2 Tinción de Gram	46
3.3 Cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA)	48
3.4 Tubo germinal	48
3.5 Producción de clamidioconidias	49
3.6 Técnicas de sembrado para clamidioconidias	49
3.7 Tolerancia a pH ácido	50
3.8 Asimilación y fermentación de carbohidratos	51
3.9 Estandarización de la prueba de sensibilidad y resistencia a la 5-Fluorocitosina	54
3.10 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 5-Fluorocitosina	55
3.11 Preparación de los medios con 5-Fluorocitosina	56
3.12 Sembrado de las placas con 5-Fluorocitosina y esquema de inoculación	56
3.13 Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias de 5-Fluorocitosina	58
4 RESULTADOS	60
5 DISCUSION	73
6 CONCLUSIONES	75
7 REFERENCIAS	76

INDICE DE CUADROS

		PAGINAS
Cuadro 1	Primeros reportes de los principales tipos de candidiasis	7
Cuadro 2	Prevalencia de los biotipos A y B de <i>Candida albicans</i> en los 46 aislamientos obtenidos de candidemias en Chile	26
Cuadro 3	Sensibilidad los biotipos A y B de <i>Candida albicans</i> con Tres agentes antifúngicos	26
Cuadro 4	Estructura antigénica de mayor patogenicidad en especies de <i>Candida</i>	29
Cuadro 5	Muertes por candidiasis por millón de la población	35
Cuadro 6	Aislamientos de especies de <i>Candida</i> en pacientes pediátricos	36
Cuadro 7	Porcentaje de concordancia entre los diferentes métodos comercializados para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos	43
Cuadro 8	Pruebas de asimilación (Auxonogramas) y fermentación (Zimogramas) De elementos de carbono	53
Cuadro 11	Relación entre el porcentaje de <i>Candida albicans</i> tanto en humanos como en bovinos sensibles a la 5-Fluorocitosina y su correspondiente concentración Inhibitoria.	61
Cuadro12	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de exudado faríngeo en pacientes femeninos	61
Cuadro13	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de exudado vaginal en pacientes femeninos	62
Cuadro 14	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de urocultivo en pacientes femeninos	63
Cuadro 15	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de exudado faríngeo en pacientes masculinos	63
Cuadro 16	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de exudado uretral en pacientes masculinos	64
Cuadro 17	Cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de mastitis en bovinos hembra	65

INDICE DE FIGURAS

		PAGINAS
Figura 1	Formación de clamidioconidias	13
Figura 2	Formación de Tubo germinal	14
Figura 3	Diagrama esquemático de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	16
Figura 4	Representación de las manoproteínas de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	17
Figura 5	Diagrama de Flujo: Clasificación de candidiasis	19
Figura 6	Muertes anuales por candidiasis en varios países	34
Figura 7	Mecanismo de acción de la 5 Fluorocitosina	38
Figura 8.	Diagrama de flujo metodológico	44
Figura 9	Multi-inoculador de 64 asas bacteriológicas calibradas	57
Figura 10	Esquema de inoculación de cepas de <i>Candida albicans</i>	58
Figura11	Inhibición o crecimiento de diversas cepas de <i>Candida albicans</i> placas de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) Y diferentes concentraciones de 5-Fluorocitosina	59
Figura 12	Porcentaje de cepas de <i>Candida albicans</i> por población muestreada	66
Figura 13	Comparación entre la sensibilidad y resistencia de cepas de <i>Candida albicans</i> frente a la 5-Fluorocitosina en las tres poblaciones	67
Figura 14	Relación entre el porcentaje de sensibilidad a la 5-Fluorocitosina Y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en cepas de pacientes masculinos y femeninos a partir de exudado faringeo.	68
Figura 15	Comparación del porcentaje de sensibilidad y las CMI en cepas de <i>Candida albicans</i> a partir de exudado vaginal y urocultivo en pacientes femeninos	69
Figura 16	Relación entre el porcentaje de sensibilidad a la 5- Fluorocitosina Y las CMI en cepas de bovinos con mastitis	70
Figura 17	Número de cepas sensibles a la 5-Fluorocitosina de acuerdo a sus CMI en las tres poblaciones estudiadas.	71
Figura 18	Distribución en porcentaje de acuerdo al biotipo de <i>Candida albicans</i> en las tres poblaciones estudiadas.	72

1 INTRODUCCION

1.1 Marco Histórico.

Desde la antigüedad *Candida albicans* ha sido reconocida como una entidad clínica. Hipócrates, en su "Epidemics" describe dos casos de algodoncillo oral y su frecuente ocurrencia entre los niños. Las enfermedades causadas por *Candida* ya se mencionan por Samuel Pepys en su diario del 17 de Junio de 1665. Algunas condiciones reconocibles como candidiasis oral y gastrointestinal fueron descritas por Rosen Von Rosenstein en textos de pediatría en 1771 y por Underwood en 1784. [11]

1.2 Estudios Iniciales.

Los descubrimientos iniciales del organismo causante de enfermedades bucales no fueron hechos sino hasta 1839, cuando Langenbeck describe un hongo en un afta bucal en un caso de Tifo. Si bien Langenbeck sugirió que el hongo fue la causa del tifo, su descripción fue sin embargo, una de las primeras en sugerir y asociar al microorganismo con el proceso patológico. En 1846 Berg fue el autor inicial en describir de manera trascendental la relación entre el hongo filamentoso y las lesiones bucales, dos años antes Bennett describe la apariencia microscópica de un hongo en el esputo y pulmones de un paciente con tuberculosis, el cual bien pudo haber sido *Candida albicans*. [11]

Uno de los aspectos más importantes a considerar es el relativo a los distintos nombres que ha recibido la principal especie patógena: *Candida albicans*. Desde que Robin la denominó en 1853 *Oidium albicans* siendo de esta manera la primera vez que se nombrara a la especie *albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros. De estos géneros, sólo 2 han prevalecido por largo tiempo para referirse a esta especie: El Género *Monilia*, en el cual estaba incluido la especie *Monilia candida* (Plaut, 1885), luego *Monilia albicans* (Zopt, 1890) que dominó la literatura hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el Género *Candida* y la especie *Candida albicans*, que fue aceptado por el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Desde entonces se pasaron al Género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el Género *Monilia*, por lo cual todas las afecciones producidas por *Candida* se conocen con el nombre de Candidiasis. [11]

[26]

Durante muchos siglos, estos descubrimientos sobre el hongo filamentosos fueron el principal problema para su estudio o clasificación taxonómica. Por lo cual algunos autores tuvieron mucho cuidado para establecer el género botánico y la especie. Otros aislamientos similares de levaduras de material clínico han generado problemas en el nombramiento de la especie. Guby sitúa al hongo de Lagenbeck en el género *Sporotrichum* en 1842, Quinquaid propone el nombre de *Syringospora ribinii* en 1868, y Reess, en 1877 menciona al hongo *Saccharomyces albicans*. [11]

Las descripciones similares de las formas filamentosas condujeron la atención hacia la naturaleza dimórfica del hongo. Gawitz en 1877, (quien incidentalmente mencionó al hongo *Mycoderma vini* describe la gemación de la forma levaduriforme, la forma del micelio y las Clamidioconidias, aunque no les da el nombre. Audrey provee definitivamente que las diferencias morfológicas observadas del hongo y de otros organismos dependen de su crecimiento en el medio ambiente. [11][26]

El género *Monilia* fue introducido en 1751 en la clasificación de algunos hongos aislados de la vegetación comenzando con la asociación del hongo filamentosos y la finalización del siglo XIX. Plaut en 1887 aisló levaduras de un hongo de la madera carcomida de un tronco con las cuales produjo lesiones similares al algodoncillo oral en el cuello de algunos pollos. A Wilkinson se le acredita la primera descripción de candidiasis vaginal así como su etiología. Hausmann demostró en 1875 que el hongo causante de candidiasis oral y vaginal era el mismo hongo. La primera descripción completa de otras formas superficiales de candidiasis no apareció sino hasta los primeros años del siglo XX; sin embargo, es probable que la candidiasis cutánea se halla conocido clínicamente mucho antes. En el siglo XIX si bien se ha reconocido que las enfermedades debilitantes predisponen a los pacientes a la candidiasis. El primer reporte de candidiasis sistémica en el cual se identifica al organismo causal se emitió en el año 1862 por Zenker, el cual describe como un paciente cuyo muere por la aparición de candidiasis cerebral presente en un paciente inmunocomprometido. El **Cuadro 1** muestra los años de aparición o descubrimiento de las primeras descripciones clínicas de candidiasis. [11]

Cuadro 1 Primeros reportes de los principales tipos de candidiasis [11]

Tipo de Lesión por Candidiasis	Dato de la primera descripción clínica	Autor
Algodoncillo Oral	Año 4 antes de Cristo	Hipócrates
Candidiasis Esofágica	1835	Véron
Candidiasis Vaginal	1849	Wilkinson
Candidiasis Cerebral	1862	Zenker
Candidiasis Diseminada	1890	Schmori
Onicomycosis por Candida	1904	Dubendorfer
Candidiasis Cutánea	1907	Jacobi
Candidiasis Mucocutánea Crónica	1904	Forbes
Artritis por Candida	1921	Goldring
Paroniquia por Candida	1925	Kingery & Thienes
Cistitis por Candida	1927	Rafin
Ostemieltis por Candida	1928	Connor
Nefritis por Candida	1931	Lundquist
Endocarditis por Candida	1940	Joachim & Polayes
Endoftalmitis por Candida	1943	Miale
Corioamnionitis por Candida	1958	Benirschke & RapHael

Odds FC en su libro *Candida and candidosis* menciona que Castellani, quien es mejor conocido por sus reportes de enfermedades inusuales y exóticas hace una amplia investigación de las micosis por levaduras al inicio del presente siglo, su reporte de "Tea – Taster´s Cough" en 1912 fue el primer antecedente de candidiasis broncopulmonar, y fue Castellani el primero en sugerir que otras especies de levaduras podrían además de *Monilia albicans* estar involucradas en la patogénesis de la candidiasis. Además algunas de las "nuevas cepas" de Castellani las cuales son en características similares a *Candida albicans* actualmente se conocen como *C. guillermontii*, *C. kefyri*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Castellani frecuentemente situó sus especies dentro del género *Monilia* y esto produjo una confusión taxonómica en el último siglo con los resultados erróneos que perduran en la actualidad. [11][26]

1.3 Justificación

La Candidiasis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, existen varias especies de *Candida* involucradas en distintas patologías en el humano.

La identificación y caracterización tanto de las especies como de los productos liberados por ellas ha sido relevante para los estudios diagnósticos y epidemiológicos, la biotipificación, el diagnóstico bioquímico y molecular han sido herramientas indispensables para la identificación del género y especie, además de enzimas y proteasas liberadas por estos microorganismos. Es así que la biotipificación resulta también una herramienta más que importante en los procesos de identificación taxonómicos de *Candida albicans*.

1.4 Hipótesis

Si analizamos las cepas de *Candida albicans* mediante una técnica que nos demuestre la sensibilidad o resistencia empleando a la 5-Fluorocitosina como agente antimicótico que las diferencie, obtendremos la clasificación de sus biotipos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Realizar la biotipificación de cepas de *Candida albicans* de origen humano y bovino mediante la prueba de 5-Fluorocitosina.

2.2 Objetivos particulares

1. Llevar a cabo la identificación de cepas de *Candida albicans* de origen humano y bovino obtenidas de diferentes patologías mediante pruebas específicas.
2. Estandarizar la prueba de inhibición a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que presenten las diferentes cepas de *Candida albicans* a la 5-Fluorocitosina
3. Realizar la clasificación de cepas de *Candida albicans* de origen humano y bovino en biotipo A y biotipo B

2.3 Generalidades de *Candida albicans*

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular.

Las infecciones por varios miembros de este género han sido reportadas en un rango siempre creciente de sitios anatómicos. En muchos casos el reporte de infección por *Candida* provee evidencia insuficiente para confirmar el diagnóstico, sin embargo los postulados de Koch en todos los casos siempre han sido satisfactorios. [26]

Las diez especies que se enumeran a continuación se consideran como patógenos potenciales particularmente en pacientes inmunocomprometidos. [26][11]

<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida Kefyr</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida viswanthii</i>

2.4 Candidiasis

La Candidiasis es una infección aguda o crónica causada por especies de *Candida* generalmente *albicans*, en la cual el hongo puede producir lesiones en boca, vagina, piel, uñas, bronquios o pulmones y ocasionalmente septicemia, endocarditis o meningitis. [8][9][12]

La candidiasis puede ser una enfermedad ocupacional o transmitirse por contacto sexual, los factores predisponentes son muchos y en ocasiones pueden combinarse, por ejemplo en boca se relacionan con la aplicación local de antibióticos o pérdida del espacio interdentario por el uso de prótesis inapropiadas, las formas intestinales, con el consumo de dietas ricas en frutas, el intertrigo y la onicomosis de manos, con humedad, contacto con alimentos que tienen alto contenido de azúcares. [12]

2.5 Taxonomía

Reino:	Fungi
Phylum:	Deuteromicota
Clase:	Blastomicetes
Familia:	Criptococcocea
Género:	Candida
Especie:	albicans [9][26]

C. albicans es un hongo dimórfico y miembro de la flora endógena humana, el cual continua adquiriendo importancia como un serio patógeno en pacientes inmunodeprimidos, tanto en enfermedades hematológicas como en el SIDA. [3][29]

2.6 Características de *Candida albicans*

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. [8][9][26]

Las levaduras o blastoconidios son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie del blastoconidio. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células[9][26]

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastoconidios o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical [9][11][26]

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Grampositivas, pero en algunas ocasiones la forma de los blastoconidios puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de los blastoconidios (levaduras) gemantes a hifas. [8][9][26]

Por su parte, Samson sostiene que el material blanco que crece en los medios de cultivo consiste desde el punto de vista microscópico, en pseudomicelio actualmente llamados filamentos de *Candida albicans*. Se presenta bajo condiciones de cultivo semi-anaeróbico o facultativo y está formado por células elongadas que se mantienen unidas entre sí como una cadena y blastoconidias o blastoconidios que están agrupadas en montones a lo largo del pseudomicelio, en los sitios en que los extremos finales de las células pseudomiceliales se empalman con otras. [26]

En contraste con otras especies de *Candida*, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidioconidias, sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como Agar Harina de Maiz; la clamidioconidia tiene un diámetro de 7 a 8 micras y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *C. albicans*. La **Figura 1** muestra un proceso de formación de Clamidioconidias en las hifas[8][9][10].

Figura 1.-Formación de Clamidioconidias.



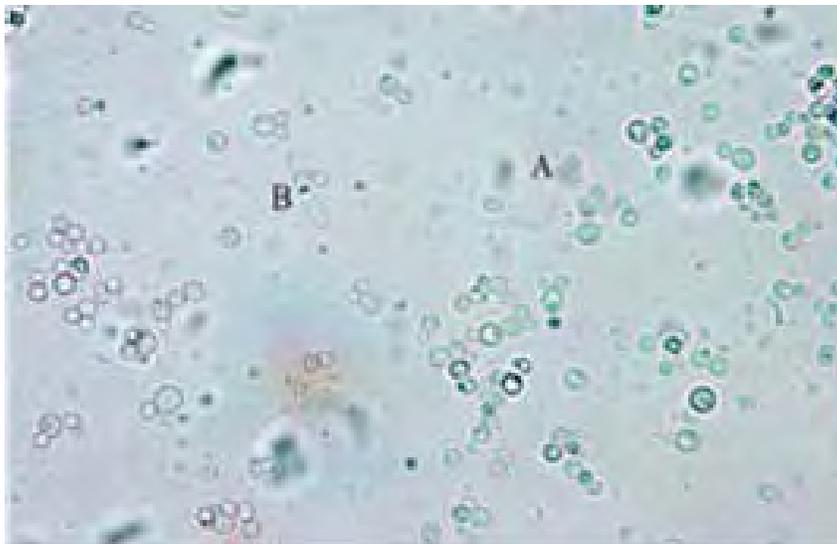
[28]

Asimismo, tiene la capacidad para producir tubos germinales (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0,5 mL. de suero a temperatura de 37°C. 2 o 3 horas [26][28]

Un tubo germinal se define como una extensión filamentososa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula. El tubo germinal de *Candida albicans* ha sido descrito como un tubo sin constricción en el punto de origen y tiene una apariencia similar a "espejo de mano". Este puede formarse al inocular células de *C. albicans* en suero humano (inclusive si el suero ha sido congelado y almacenado), así como en suero de diversos animales como perro, bovino, conejo, cochino de Guinea y caballo. [8][9][26]

La formación de tubos germinales en suero como lo muestra la **Figura 2** con la formación de un tubo germinal de varias levaduras está afectada directamente por la concentración celular en el inóculo, ya que la proporción de células capaces de formar filamentos, disminuye progresivamente al aumentar la concentración celular por encima de 10⁷ células por mL, de igual forma, el rango de temperatura en el cual se forman los tubos germinales oscila entre 31°C y 41°C [11][26][28]

Figura 2.-Formación de Tubo Germinal



[28]

La composición química de la pared celular de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono [26]

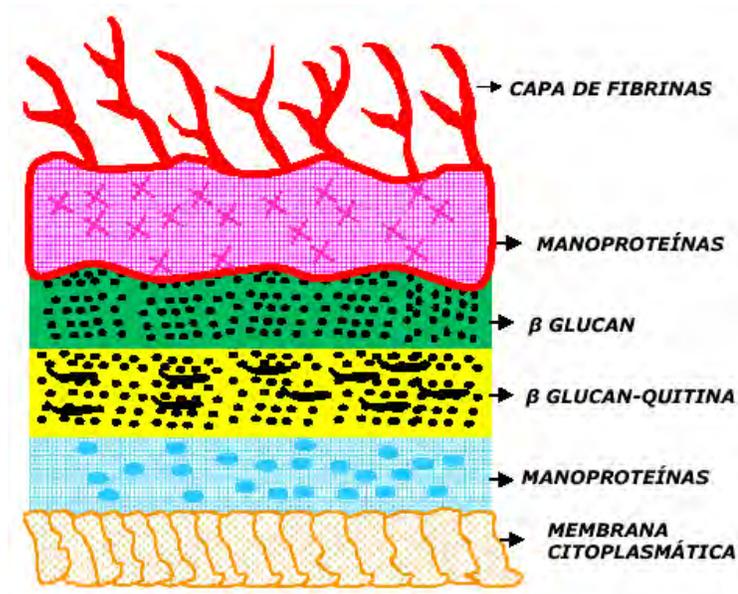
La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manana, Glucán y Quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. [26]

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja micro arquitectura. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera) manoproteínas, β -Glucán-Quitina, β -Glucán, manoproteínas y una capa de fibrillas. [26]

El polisacárido manana representa aproximadamente entre 15.2 y 22.9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47 y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6 y 25%, lípidos entre 1 y 7% y quitina entre 0.6 y 9% del peso de la pared celular. Las proporciones de los componentes que constituyen la pared celular de las levaduras y de los tubos germinales es relativamente similar, aunque la cantidad de glucán alcali-soluble y alcali-insoluble y de quitina de *C. albicans* varía de acuerdo con la forma de crecimiento.

La **Figura 3** muestra la pared celular la cual tiene un espesor variable y está compuesta por varias capas, las cuales se han puesto de manifiesto por diferencias en la densidad electrónica. [26]

Figura 3 Diagrama esquemático de la pared celular de *Candida albicans*



[26]

Poulain y colaboradores han observado hasta ocho o nueve capas en la pared celular de *C. albicans*, aunque estos resultados se refieren a una variedad de paredes celulares provenientes de células que crecieron en diferentes medios de cultivo y en distintos períodos de tiempo. [26]

Se ha demostrado que después de cultivar a *C. albicans* en medios con carencia de nutrientes y someter al hongo bajo esas condiciones por períodos de tiempo muy prolongados, las capas de manana de la pared celular desaparecen gradualmente[26]

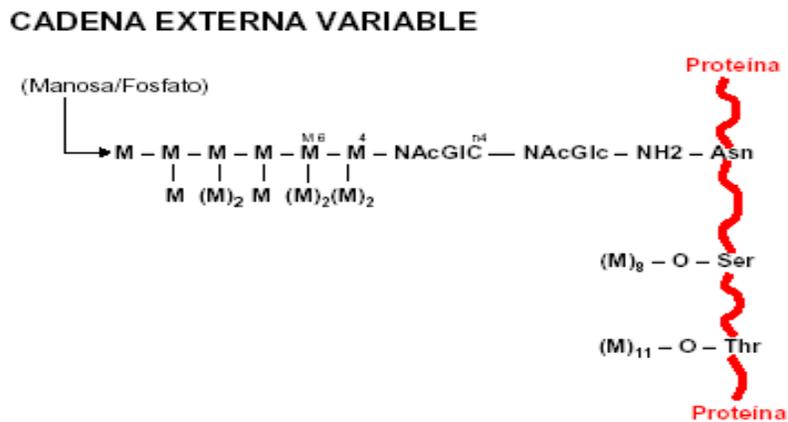
Los polisacáridos del tipo manana están localizados a lo largo de la pared celular y éstos, predominan en las zonas de alta densidad electrónica. Las capas internas de la pared celular están compuestas mayormente por quitina y glucán. Estos componentes le dan rigidez a la célula y son esenciales para la división celular. Están presentes tres tipos de glucán: 1) glucán β -1,6 altamente ramificado, 2) glucán β -1,3 altamente ramificado y 3) Un glucán muy complejo β -1,6- β -1,3 mezclado con quitina. Las proporciones de ciertos tipos de glucán difieren entre las levaduras y los tubos germinales de *C. albicans*. Durante las primeras etapas de la formación del tubo germinal, se sintetiza casi exclusivamente glucán β -1,3. La quitina se encuentra en las células en forma de levadura, en las hifas y en los tubos germinales, aunque la proporción es mayor en las hifas: [26]

La capa externa de fibrillas de la pared celular de *C. albicans*, tanto en levaduras como en hifas está compuesta de manana o manoproteínas, aunque este componente también está localizado en varios lugares de la pared celular. Esta capa ha sido descrita en ocasiones como un revestimiento mucoso o capsular. [26]

La pared de manana ha sido identificada como el principal antígeno de la superficie celular de *C. albicans*. Basados en estudios de adsorción y aglutinación, Hasenclever y Mitchell en 1960, agruparon a *C. albicans* en dos biotipos designados A y B. [26][37][40]

Básicamente, la representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* está constituida por residuos de manosa unidos entre sí por enlaces α -1,6, los cuales se unen a la porción de proteína a través de dos residuos de N-acetil glucosamina (unidos entre sí por enlaces β -1,4) y un residuo de asparagina y residuos de manosa que se unen a la proteína a través de residuos de los aminoácidos serina y treonina así como lo indica la **Figura 4** donde se esquematiza los diferentes enlaces químicos entre los distintos aminoácidos que conforman a las manoproteínas. [26]

Figura 4.-Representación de las manoproteínas de la pared celular de *Candida albicans*.



[26]
 NAcGlc=N-AcetilDGlucosamina
 M=Manosa
 Ser=Serina
 Thr= Treonina
 Asn= Asparagina
 Tomado de Calderone y Braun, 1991.

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antibióticos antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción [26]

En el citoplasma, al igual que otras células eucarióticas, *C. albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que, contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucléolos, ADN y ARN y varios cromosomas. [26]

El metabolismo de *C. albicans* se ha relacionado de una forma directa o indirecta con la patogenicidad, la morfología o con los efectos de los antibióticos antimicóticos. El metabolismo de los carbohidratos juega un papel importante en la morfogénesis, en tanto que el metabolismo de aminoácidos y lípidos tiene poca importancia para el crecimiento de este microorganismo [26]

Se han podido detectar distintos tipos de fosfolípidos en diversas especies de *Candida* provenientes de cavidad bucal, tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr*. Los principales fosfolípidos identificados fueron: Fosfatidiletanolamina y Fosfatidilglicerol. Estos fosfolípidos son muy importantes en relación con el normal funcionamiento de la membrana citoplasmática de los hongos antes mencionados [26]

En un estudio reciente, se determinaron cambios fenotípicos en cepas de *C. albicans* aisladas de la cavidad bucal de pacientes con trasplante renal. Se ha sugerido que las cepas del hongo en las que se observaron los cambios fenotípicos, pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales debido a variaciones en sus propiedades bioquímicas, físicas y fisiológicas [26]

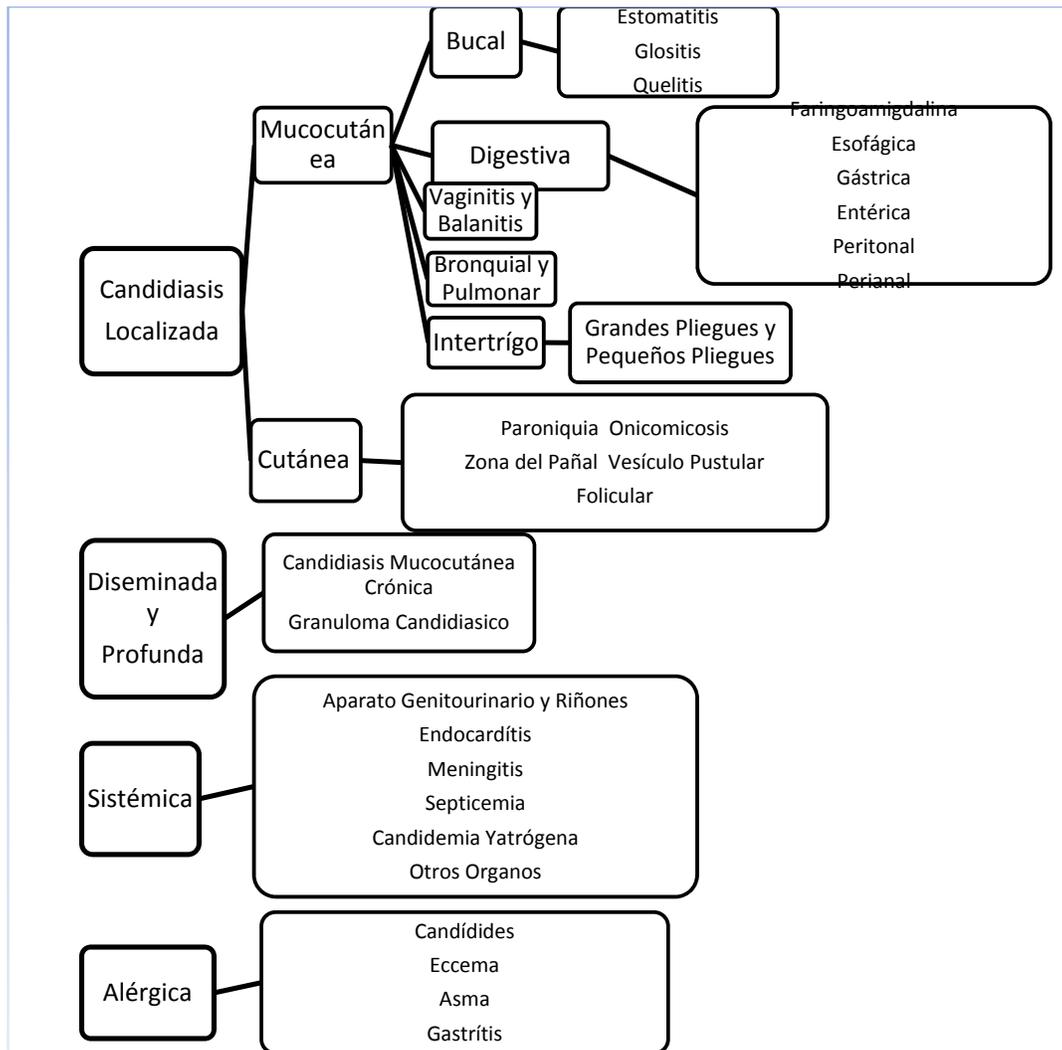
Candida es una levadura con capacidad para producir filamentos, la fase de levadura está relacionada con la fase saprofitica y con la iniciación de lesiones clínicas; en cambio la fase micelial se relaciona con la forma parasitaria e invasora, a la inversa de casi todos los hongos dimórficos. [9]

En los hospedadores inmunocomprometidos, la mayoría de las infecciones por *C. albicans* se cree que son de origen endógeno y estudios recientes sugieren que esta suposición podría ser válida, ya que la gravedad de la infección depende más de las alteraciones primarias del hospedador que de la patogenicidad del hongo, mientras tanto se sigue considerando a *C. albicans* como el más virulento y fenotípicamente diverso hongo de los humanos. [3]

Aún no se ha establecido si el biotipo y el estado fenotípico de la levadura así como el estado inmune del hospedador, son los factores para disparar la respuesta de este organismo hacia los agentes antimicóticos. En pacientes con SIDA se encuentra con mayor frecuencia *C. albicans* biotipo B, pero al parecer no son cepas en particular virulentas. [2]

2.7 Clasificación de Candidiasis

El siguiente diagrama de flujo da inicio a la clasificación de los diferentes tipos de candidiasis en el humano.



2.7.1 Candidiasis de las mucosas

a) La infección bucal por *C. albicans* da origen a típicas manchas blancas cremosas, pueden verse otras lesiones en forma de pequeñas o grandes placas únicas o múltiples diseminadas por la mucosa a la cual se adhieren. En algunos pacientes la mucosa tiene color rojo intenso, son asintomáticas o se acompañan de sensación de quemadura, sequedad de boca y sabor metálico, la evolución es aguda o crónica. [33]

En la cavidad bucal de sujetos portadores de especies de *Candida*, la especie comprende entre 60 y 70% de los aislamientos, *C. tropicalis* comprende 7%, en tanto que *C. krusei* y *C. guilliermondii* son aislados con mucha menor frecuencia[9] [33]

Una etapa temprana y esencial en el desarrollo de la candidiasis bucal es la colonización de la cavidad bucal por parte de *C. albicans*, un proceso que involucra la adquisición, adherencia y mantenimiento de una población estable de levaduras. La boca posee muchos nichos para la colonización por parte de esta especie, incluyendo entre otras células epiteliales, prótesis dental y células bacterianas de la flora bucal residente. [26] [33]

b) Glositis crónica, se revela por la presencia de una lengua lisa con papilas atróficas o en forma de lesiones blancas localizadas en ambos lados de la lengua. Las lesiones localizadas se adhieren firmemente a la lengua, ligeramente elevadas se asemejan a copos de nieve. [9][33]

c) Lengua vellosa o peluda, se le ha atribuido a *C. albicans* este padecimiento el cual es debido a la presencia de la *Candida* como un invasor secundario, y de otros hongos en la cavidad bucal en las papilas hipertrofiadas. La lengua vellosa puede depender de irritación causada por el uso de líquidos enjuagatorios demasiado fuertes, abuso del tabaco, aseo inadecuado. [9][33]

d) Las boqueras se caracterizan por la aparición de grietas en las comisuras de la boca. Se trata de lesiones maceradas fisuradas o erosionadas con una base eritematosa y húmeda debido a carencia de riboflavina la cual propicia la proliferación de *C. albicans*. [9]

e) La vulvovaginitis es frecuente durante el embarazo y en la diabetes; en pacientes diabéticos la infección puede estar relacionada con las altas concentraciones de azúcar existentes en la sangre y orina, en el embarazo se considera como factor pre- disponente, el exceso de productos de tipo glucocorticoide en la vagina.

Las lesiones parecen dermatitis eczemática simple o presentar pústulas vesiculosas escoriadas y en algunos casos ulceración. La vulvovaginitis constituye una de las primeras afecciones ginecológicas y su causa más frecuente es la candidiasis, *Candida albicans* ha sido considerado el agente más importante de esta patología; sin embargo, estudios más recientes revelan un incremento en la incidencia de otras especies del género. [9][28][32][38]

Observaciones clínicas indican que algunas mujeres nunca desarrollan una candidiasis vulvovaginal sintomática, un segundo grupo sufre de episodios aislados y un tercer grupo padece episodios repetidos y a veces infección crónica. Se ha estimado que aproximadamente el 75% de todas las mujeres experimentan al menos un episodio de candidiasis vaginal en su vida, y de éstas el 20% experimentan un episodio posterior [28][32][38].

La candidiasis vulvovaginal recurrente, definida como cuatro o más episodios anuales, se presenta en al menos el 5% de las mujeres que han experimentado un episodio de candidiasis vulvovaginal Primaria Esporádica. [32]

La candidiasis es la causa más frecuente de vulvovaginitis en Europa y la segunda en los Estados Unidos; candidiasis, vaginosis bacteriana y tricomoniasis constituyen el 90 % de los diagnósticos microbiológicos de vulvovaginitis. En la última década se ha observado una disminución en la incidencia de la tricomoniasis y un incremento de la vulvovaginitis candidiásica del 13 % en mujeres americanas y del 19 % en la población europea. Se estima que el 75 % de las mujeres en edad reproductiva experimenta al menos un episodio de VVC; de éstas, el 50 % tiene un segundo episodio y en el 5 al 10 % la infección se convierte en recurrente. La mayoría de autores describen una incidencia de colonización vaginal asintomática del 15-20 % y este tanto por ciento, se eleva al 30-40 % durante el embarazo. La vulvovaginitis candidiásica se produce en todos los grupos socioeconómicos del mundo. La tasa de colonización es menor en mujeres prepúberes y posmenopáusicas, lo cual enfatiza la dependencia hormonal de la VVC5. [32][38]

Dentro de las vulvovaginitis por *C. albicans*, es más frecuente el biotipo A que el B,[38]

2.7.2 Candidiasis cutánea

Se describen dos tipos de infección:

1. Lesiones Localizadas
2. Lesiones Generalizadas

Las lesiones cutáneas localizadas se manifiestan en grandes porciones de la piel pudiendo encontrarse en manos y cuerpo, se observan más frecuentemente en personas con diabetes y en individuos cuyas ocupaciones les obligan a sumergirse constantemente en agua; propiciando un mayor grado de humedad en la piel siendo este un factor pre-disponible para la infección por el hongo, entre otros factores destacan la obesidad; alcoholismo, estasis vascular y sudoración profusa. [9]

a) Oniquia y Paroniquia, son las manifestaciones localizadas más frecuentes de la candidiasis cutánea y se caracterizan por dolor y tumefacciones rojizas que a menudo parecen lesiones piógenas pero no contienen pus, La uña se endurece, engruesa y cubre de surcos y a veces se torna de un color parduzco pero conserva gran parte de su brillo y no se torna quebradiza, no acumulándose residuos debajo de la misma como en pacientes con tiña ungueal. [9]

b) Intertrigo, se caracteriza por placas sudativas, eritematosas, bien marginadas con bordes pápula escamosa con vesículas y pequeñas pústulas. El intertrigo se localiza en pliegues como axilas, áreas infra mamarias, ombligo, glúteos e íngles. [9]

c) La candidiasis perianal produce prurito de ano de tipo macerativo color blanco y se parece a la variedad húmeda de la infección causada por dermatofitos. [9][28]

2.7.3 Candidiasis generalizada

Es muy resistente al tratamiento, las lesiones se asientan sobre la piel sin pelo y suelen asociarse a glositis, estomatitis paroniquia y otros tipos de infección localizada. La infección radica casi siempre en las zonas inframamarias, ombligo y pliegues de glúteos pueden adquirir tipo eccematoide o cubrirse de vesículas o pústulas. A menudo esta infección se encuentra en niños prematuros cuyas madres padecieron candidiasis vaginal. [9]

a) Candidiasis broncopulmonar, En la candidiasis bronquial la tos es el síntoma más característico y molesto, ya que apenas se afecta el estado general del enfermo. El esputo es casi siempre incoloro pero mucoide y gelatinoso, contiene a menudo pequeños copos grises compuestos de células fungosas por gemación y de residuos celulares. En ocasiones se cura la infección espontáneamente, pero a menudo se prolonga por años con progresión y recaídas periódicas. En candidiasis bronquial, los signos físicos corresponden a los de una bronquitis con estertores húmedos de pequeñas y medianas burbujas en las bases pulmonares. [9][25]

b) Candidiasis pulmonar, no es tan frecuente como la bronquial pero si es más grave. Estos enfermos se eleva la temperatura y el pulso, el dolor pleural es frecuente; la tos atormenta al enfermo, con esputo mucoide, gelatinoso a veces con estrías de sangre. El esputo indica con frecuencia infección secundaria con cocos piógenos, endoftalmitis, meningitis, endocarditis y puede afectar otros órganos como hígado y riñones; puede ocasionar embolia. [9][25]

c) Las formas Alérgicas no están bien estudiadas, pueden ser candidides, que a veces son lesiones vesiculares estériles en manos, o se manifiestan por urticaria, eccema, asma, y gastritis. [9]

2.8 Antecedentes de la Biotipificación de *Candida albicans*

Si bien *C. albicans* es la levadura más frecuentemente aislada de muestras clínicas como comensal y como patógeno, estudios detallados de sus orígenes y modo de transmisión en la producción de las enfermedades han sido infructuosos en ausencia de un método eficaz para una buena subdivisión de cepas y biotipos entre las especies. [4][35]

Hace cerca de tres décadas, Hasenclever y Mitchell fueron los primeros en demostrar y en desarrollar un método para serotipificar a *C. albicans* sobre las bases que hasta hoy en día existen para definir las diferencias en superficies antigénicas, este método define dos biotipos mayores A y B, la distinción realizada por estos investigadores se hizo basándose en pruebas de aglutinación. Una mejor distinción de tipos de *C. albicans* puede desarrollarse por reacciones de precipitación y por inmunofluorescencia, además es posible que *C. albicans* tipo **B** pueda expresar antígenos tipo A in vivo. Muller y Kirchhoff introdujeron un biotipo C los cuales no reaccionan claramente como tipo A ni como tipo B, tales aislamientos podrían considerarse como no tipificables. [1][3][39][40]

De acuerdo a los conceptos clásicos de biotipificación *in Vitro*, los antígenos del tipo A están ausentes de la superficie de la levadura tipo B, el biotipo C, se piensa que representa un tercer y raro tipo antigénico no agrupable por los métodos de Hasenclever, fue propuesto pero nunca aceptado ampliamente. [1][3][11][39]

Un diferente biotipo C fue introducido por Tsuchiya y col. Sobre las bases de las reacciones con antisuero de factor 7, pero esta categoría fue abandonada por las dificultades que representaba la técnica para reproducirla y diferenciar el biotipo C. En 1969, Fukazawa, Kanno, y Susuky desarrollaron un esquema de identificación de levaduras basado en patrones de aglutinación con antisueros de referencia mono específicos y en la fermentación y asimilación de sucrosa. La aglutinación de *C. albicans* por uno de los diez antisueros, el antisuero 6, reporta diferencias en las levaduras del tipo A con respecto a las del tipo B. [3]

C. albicans presenta diferencias antigénicas en las manoproteínas de la pared celular, identificándose los biotipos A y B. El biotipo A posee los determinantes antigénicos 1, 4, 5 y 6, en tanto el biotipo B carece del epitopo 6 [29].

Los estudios de biotipificación han sido realizados principalmente en candidiasis superficiales del adulto, ya sea vaginal u oral de pacientes infectados por el VIH, donde hay un amplio predominio del biotipo A. En España, al estudiar candidiasis oral de pacientes VIH, Torres-Rodríguez y col. encuentran que a pesar del predominio del biotipo A, se observa un aumento de la frecuencia del biotipo B. Para algunos, las cepas del biotipo B son menos sensibles a los antifúngicos como 5-fluorocitosina, itraconazol y fluconazol. [29]

Se ha identificado recientemente que en individuos inmunocompetentes pueden ser probablemente aislados los dos biotipos tanto el A como el B de la flora oral, pero en individuos inmunocomprometidos, incluyendo pacientes con SIDA se puede encontrar que son infectados el doble de veces tanto por el biotipo A como por el biotipo B. [42]

Hasenclever y sus colegas establecieron que *C. stellatoidea* y *C. albicans* biotipo B fueron antigénicamente similares en extremo, así como *C. tropicalis* y *C. albicans* biotipo A. Estos datos apoyan la clasificación actual de *C. clausenii* y *C. stellatoidea* como sinónimos de *C. albicans* y *C. tropicalis*; sin embargo, definitivamente pueden distinguirse antigénicamente. [3][39][40]

Entre las especies de *C. albicans* es posible distinguir fenotipos individuales para propósitos epidemiológicos, la diferencia de *C. albicans* biotipos A y B fue el primer método desarrollado para biotipificar cepas de manera rutinaria. Efforts hizo en el pasado una diferenciación de levaduras en base a su dimensión celular y a sus componentes antigénicos. [11]

La variación de las cepas a la susceptibilidad a lisis por virus ofrece una buena diferenciación que puede ser bien reproducida. Los métodos más utilizados para biotipificar a las cepas de *C. albicans* se basan en la variable resistencia a ciertos agentes químicos, asimilación de carbono y nitrógeno, inmunoblotting y diferencias morfológicas y coloniales.[11][20][21]

Recientemente en un estudio realizado en Chile por Victor Silva y col. Determinaron el biotipo de cepas como *C. albicans* por aglutinación de antisuero con anticuerpos de clase IgG, dirigidos contra el antígeno 6 de la pared celular del biotipo A (Candida Check, IATRON Inc. Japón). En ese estudio las cepas que presentaron aglutinación se clasificaron como biotipo A y las negativas como biotipo B. [29]

Victor Silva y col. en 2003 biotipificaron 47 cepas de *C. albicans* en donde 27 provenían de aislamientos de hemocultivo, 28 más eran de niños y 19 de adultos en donde la frecuencia del biotipo A fue del 67%, analizando los datos por grupos de pacientes se dieron cuenta que en los adultos existía una marcada prevalencia del biotipo A con 95% mientras que en los niños la distribución de ambos biotipos era homogénea, detectándose una frecuencia del 52%. Tal como lo demuestra el **Cuadro 2**. [29]

Cuadro 2.- Prevalencia de los biotipos A y B de *Candida albicans* en los 46 aislamientos obtenidos de candidemias en Chile

	Biotipo A n (%)	Biotipo B n(%)	Total n(%)
Niños	13(48)	14(52)	27(100)
Adultos	18(95)	1(5)	19(100)
Total	31(67)	15(33)	46(100)

Así mismo Victor Silva y col. en 2003 determinaron la sensibilidad de las cepas a tres antifungicos tales como amfotericina B, Itraconazol y Fluconazol y obtuvieron las CMI de los tres. Todas las cepas fueron sensibles a anfotericina B, y todas las del biotipo B lo fueron a los azoles. Las cepas del biotipo A fueron levemente menos sensibles a itraconazol y fluconazol, 94% y 97% de cepas sensibles, respectivamente, sin detectarse resistencia, aunque una cepa (3%) fue sensible dependiendo de la dosis a fluconazol (CMI 16 mg/mL) y dos (6%) a itraconazol (CMI 0,5 mg/mL) tal como lo muestra el **Cuadro 3** donde a continuación se presentan estos resultados. [29]

Cuadro 3.- Sensibilidad los biotipos A y B de *C. albicans* con 3 agentes antifungicos.

<i>Candida albicans</i> (n)	Amfotericina B			Fluconazol			Itraconazol		
	Rango	CMI	%S	Rango	CMI	%S	Rango	CMI	%S
Biotipo A (31)	0.03-1	0.13/1	100	0.25-16	0.25/1	97	0.03-0.5	0.03/0.06	94
Biotipo B (15)	0.03-1	0.13/1	100	0.25-1	0.25/1	100	0.03-0.06	0.03/0.06	100
Total (46)	0.03-1	0.13/1	100	0.25-16	0.25/1	98	0.03-0.25	0.03/0.06	96

[29]

A inicios de la década de 1990, en España se comunica que a pesar del predominio global del biotipo A en infecciones superficiales, el biotipo B había experimentado un aumento considerable en su frecuencia. El único trabajo previo que estudia la distribución de los biotipos de *C. albicans* en cepas de candidemia, indica un predominio del biotipo B (57.6%) en aislamientos provenientes de pacientes con un estado de inmunosupresión grave, y prevalencia del biotipo A en quienes presentaban sólo factores de riesgo para candidemia [27][29]

La incidencia de las enfermedades causadas por hongos se ha incrementado con la aparición del SIDA, donde la candidiasis se ha convertido en la micosis oportunista más frecuente. La casi totalidad de estos pacientes están colonizados por *Candida* y entre 75 y 95 % desarrollan al menos un episodio de candidiasis oral en la evolución de su enfermedad de base.[36]

C. albicans es la más patogénica entre todas las especies de *Candida* y estudios recientes han demostrado la existencia de cepas resistentes a un gran número de antimicóticos como: fluconazol, ketoconazol, inclusive amfotericina B y 5-fluorocitosina, las cuales han sido aisladas de pacientes VIH positivos. [30][36]

Un trabajo realizado en Ciudad de La Habana en el año 1990 donde se estudiaron 210 aislamientos de *C. albicans*, mostró un marcado predominio del biotipo A (95.2 %), independientemente de la raza y el sexo del paciente y del sitio de procedencia del aislamiento.[36]

Mayda Rosa Perurana y col. lograron aislar e identificar como *C. albicans* 44 cepas procedentes de diferentes muestras clínicas de pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), a las cuales se les realizaron estudios de biotipificación mediante la técnica de aglutinación en lámina. De estos aislamientos, 16 (36.4 %) pertenecieron al biotipo A y 28 (63.6 %) al biotipo B; estos resultados difieren en forma importante con el anterior. Resultados similares aparecen recogidos por Galgiani y otros a partir de los datos de diferentes series entre pacientes de SIDA en varios países, en los cuales la prevalencia del biotipo B fluctuó entre 7 y 65 %. [36]

La biotipificación puede ser utilizada como un marcador epidemiológico al tratar de precisar la fuente de infección especialmente cuando es de origen intrahospitalaria, por otra parte, está bien demostrado por Drouhet y col. que existen diferencias en cuanto a la sensibilidad antifúngica entre estos biotipos. [42]

Estudios realizados en Venezuela por Mendoza y col. con aislamientos de *C. albicans* obtenidos de pacientes no inmunocomprometidos con diversas formas clínicas de candidiasis, procedentes de diferentes regiones del país, encuentran al biotipo A como el más frecuente (69%). Por otra parte, se ha encontrado en estudios en los Estados Unidos, una incidencia del biotipo B, mayor que la descrita en los países europeos y ha sido referido que individuos inmunodeprimidos pueden presentar una doble probabilidad de estar colonizados o infectados con dicho biotipo. [26][28][37]

Drouhet y col. encontraron que en 135 pacientes VIH positivos el 52.6% de los aislamientos correspondieron a biotipo A y el 42.7% al biotipo B. También Drouhet ha descrito variaciones en los biotipos durante la evolución de la enfermedad, indicando que cinco aislamientos de biotipo A fueron reemplazados por B y que un biotipo B fue reemplazado por A. [42]

2.9 Estructura antigénica de *Candida albicans*

Las características morfológicas y fisiológicas no son los únicos parámetros para el establecimiento de las especies aunque se encuentran dentro de las pruebas tradicionales de laboratorio las cuáles muestran buena reproducibilidad. Las pruebas serológicas han sido aplicadas a la tipificación de cepas de acuerdo a su estructura antigénica lo cual ha sido muy útil para la clasificación taxonómica de levaduras patógenas y en algunos laboratorios como método para la identificación de especies. [11]

Los estudios iniciales de este tipo indicaron un grado considerable de similitud antigénica entre especies de *Candida*. Jonsen fue el primero en mostrar que esta reactividad cruzada se fundamenta en las similitudes en los polisacáridos de superficie entre especies de *Candida*. [11][23]

En 1961 un grupo de investigadores en Japón dirigido por Tsuchiya estudiaron muchas especies de *Candida* con pruebas de aglutinación cruzada, se clasificaron 22 especies de acuerdo a pruebas de estabilidad y habilidad al calor de sus componentes antigénicos. Todas las especies de *Candida* tuvieron un antígeno en común y algunas demostraron tener dos. El trabajo de Tsuchiya fue el primero en haber confirmado la existencia de varios antígenos y en la actualidad se comercializa un kit de antisuero de "Factor de Tsuchiya" para la identificación de levaduras. [11]

Estudios subsecuentes de antigenicidad cruzada entre especies de *Candida* patógenas muestran considerables similitudes antigénicas entre *C. albicans* y *C. tropicalis* mientras, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* tienen comparativamente distintos complementos de antígenos además ellas pueden hasta cierto punto reaccionar cruzadamente entre sí. [11][17] [30]

La estructura antigénica del género *Candida* es compleja, y ha sido demostrada la existencia de antígenos citoplasmáticos de naturaleza proteica y antígenos glicoproteicos presentes en su pared celular, los cuales han sido químicamente definidos como manano-proteínas, glucano-proteínas y glucanomanano-proteínas. El manano es el de mayor actividad antigénica. [36]

C. albicans biotipo A contiene todos los determinantes antigénicos del biotipo B el cual tiene algunos adicionales a las mananas; estos fueron determinados por Tsuchiya como "Factor 6". Según lo comenta Odds en su artículo y se demuestra en el **Cuadro 4**. [11]

Cuadro 4 Estructura antigénica de mayor patogenicidad en especies de *Candida*, tomado de Tsuchiya Murray y Bucley con referencia de la Iatron Co (Tokyo) "Candida Chek"

Especies	Componente Antigénico (N° de Factor)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	13b	34
<i>C. albicans</i> Tipo A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	V	-
<i>C. albicans</i> Tipo B	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	V	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	L	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	+	-	-	V	-	-	-	-	-	L	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	V	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Reacción positiva con antisuero
 - = Reacción negativa con antisuero
 V = Reacción Variable con antisuero
 L = Reacción ligera con antisuero [11]

Las variaciones antigénicas que muestra el cuadro anterior resultaron de variaciones en las posiciones de ensamble entre residuos de manosa y el número de residuos de manana en un lado de la cadena. Fukasawa y colegas han tenido progresos importantes en la identificación inmunoquímica de algunos de los factores antigénicos descritos en el cuadro anterior. [11]

Especies de *C. albicans* tienen determinantes antigénicos en común con otros géneros de levaduras y con muchos otros organismos; por ejemplo, *C. albicans* reacciona cruzadamente con antígenos de otros hongos incluyendo *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* y algunos hongos dematóceos, otras especies de *Candida* reaccionan con algunas bacterias entéricas como *Salmonella cholerae-suis* y con algunas micobacterias. [11]

2.10 Patogénesis de la Candidiasis

La candidiasis es cosmopolita, se considera como una de las enfermedades por oportunistas más frecuentes en seres humanos, la incidencia se ha elevado durante los últimos 20 años, constituyendo un 25% de las micosis superficiales, afecta a individuos de cualquier edad, raza o sexo. No tiene relación con el clima, situación geográfica o nivel socioeconómico. La gravedad de la infección por *Candida* depende sobre todo de las alteraciones primarias sobre el hospedador más que de las propiedades patógenas del hongo, la especie causal más frecuente y virulenta es *C. albicans* (90%). [9]

C. albicans es la más frecuente de las especies que causan infecciones en humanos, seguida por *C. tropicalis*, *C. parasilopsis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata*. Todos estos agentes, pueden causar un espectro similar de enfermedades, desde infecciones mucocutáneas hasta enfermedades invasivas tales como artritis, osteomielitis, endocarditis, endoftalmitis, meningitis o candidemia. Sin embargo, existen diferencias en severidad y sobre todo, hoy día podemos encontrar diversas opciones terapéuticas dependiendo de la especie involucrada. [35]

Candida es una levadura con capacidad para producir filamentos, la fase levaduriforme está relacionada con la fase saprofítica y con la iniciación de lesiones clínica; en cambio la fase micelial se relaciona con la forma parasitaria e invasora, a la inversa de casi todos los hongos dimórficos. [32]

Candida es un organismo dimórfico; la blastoconidia o blastoconidia es la forma fenotípica responsable e la diseminación y la más frecuente en la Candidiasis vaginal y la forma germinativa, caracterizada por la producción de micelios es la comúnmente aislada en el estado invasivo, o patógeno. [32]

En estudios recientes se señala que las levaduras se adhieren por medio de las mananas al epitelio antes de invadirlo; se ha encontrado en la pared celular de la glicoproteína ácida que es el componente antigénico de mayor importancia; también se ha encontrado una candidotoxina que in vitro es tóxica para células animales e in vivo produce el eritema. Por estudios citoquímicos se ha encontrado que la superficie de la levadura tiene gran importancia durante el fenómeno de invasión y destrucción quizá por la formación de fosfolipasas y de enzimas hidrolíticas las cuales se expresan sobre la membrana del hongo y actúan dañando las paredes celulares del huésped. [27]

En la respuesta inmunológica, al parecer son fundamentales deficiencias de la inmunidad celular y de la función fagocitaria en una acción efectiva contra *Candida*; las anomalías de los linfocitos T se acompaña de deficiencia de linfocinas activadoras de macrófagos y por consiguiente, de fagocitosis inadecuada. Por otra parte, las paredes celulares de *C. albicans* inhiben la fagocitosis por neutrófilos, quizá por un mecanismo competitivo entre el polisacárido de la pared celular y los receptores de superficie del neutrófilo. Una hipótesis interesante señala que la disfunción de macrófagos depende de exceso de prostaglandina E, y por ende, Inhibición de la función de células T. [27]

Por otro lado el sistema de células B y los anticuerpos tienen una participación secundaria que consiste probablemente en estimular a los macrófagos para fagocitar a las levaduras.[27][31]

En pacientes pediátricos hospitalizados, la candidiasis es un problema cada vez más frecuente. El incremento de estas infecciones puede ser atribuido a factores, tales como la permanencia en unidades de cuidado intensivo, largos tiempos de cateterización, prematuridad, nutrición parenteral, cirugías, trasplantes, terapia inmunosupresora, uso de antibióticos de amplio espectro y la mayor sobrevivencia de los individuos inmunocomprometidos [26]

En pacientes con SIDA se encuentra con mayor frecuencia *C. albicans* biotipo B, pero al parecer no son cepas en particular virulentas. [37]

En un estudio realizado en Venezuela por Mireya Mendoza y col. en 2006, en dos grupos de pacientes uno infectado con VIH seropositivo y el segundo con pacientes no inmunosuprimidos, encontraron que el 91.6 % de los aislamientos de *C. albicans* obtenidos del grupo VIH positivo correspondieron al biotipo A, siendo el 8.4 % del biotipo B. No se aisló *C. albicans* en el grupo VIH negativo. [37]

Aunque la infección por *Candida* en pacientes VIH positivos varía en un amplio rango según los diferentes autores, la mayoría muestra frecuencias mayores del 50%, lo que significa que uno de cada dos individuos VIH positivos puede desarrollar candidiasis oral. [27][37]

Klein y col. En 1984 en un estudio de 22 adultos aparentemente sanos con candidiasis oral inexplicable, observaron que 19 tenían reversión de la relación CD4 / CD8 y 20 tenían linfadenopatías generalizadas; 13 de ellos (59%) presentaron una infección oportunista mayor o sarcoma de Kaposi en un intervalo medio de tres meses. Al compararse con un grupo similar, pero sin candidiasis, ninguno desarrolló infecciones oportunistas en un periodo de seguimiento de 12 meses. Los autores concluyen que la candidiasis oral en estos individuos predice el desarrollo de infección oportunista o sarcoma de Kaposi en el 50 % de los casos y se ha sugerido que la candidiasis produce un efecto inmunosupresor por los antígenos polisacáridos circulantes. [37]

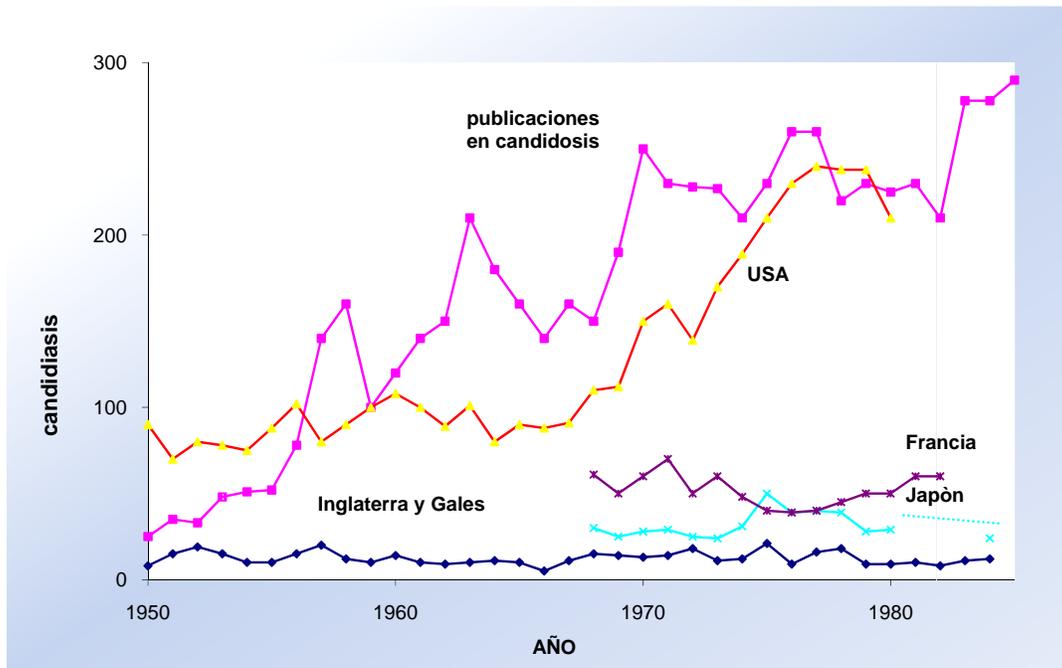
2.11 Incidencia e importancia mundial.

a) Aumento en la Incidencia de candidiasis.

Las investigaciones y publicaciones en el campo de la candidiasis son siempre abiertas, sin embargo existe un punto importante para aseverar la incidencia de la candidiasis, este punto innegablemente es el inicio de la terapéutica con agentes inmunosupresores y quimioterapia, debido a esto las infecciones por *Candida* están teniendo un importante aumento en años recientes quizá por el efecto inmunosupresor que el mismo agente produce en el organismo haciendo que la *Candida* proliferen, estudios independientes tanto en Estados Unidos como en Europa realizados entre 1961 y 1981 muestran que la prevalencia en el biotipo aislado de pacientes con candidiasis fue el tipo A (de 65 a 95%). [3][11]

En 1982, en un estudio en Estados Unidos examinando 398 muestras con *C. albicans* aisladas de individuos con padecimientos inespecíficos mostraron que las cepas biotipo A y biotipo B ocurrieron en un 50.7 y 49.3% de los aislamientos respectivamente. [3] [11]

Figura 6.-. Muertes anuales por Candidiasis certificada en Inglaterra y Gales, Francia Japón y Estados Unidos, de 1950-1984 y el número de publicaciones enlistadas bajo “moniliasis” o “candidiasis” en el index medicus de 1950-1985. En Inglaterra y Gales; Office of Population Censuses and Surveys (serie Anual); Francia Statistique de Santé; Japón, Vital Statistics series (volúmenes de 12975 1981,1982 y 1983); USA, Vital Statistics Mortality.



Los datos de la Figura 6 y de la Cuadro 5 muestran que existen pocos cambios en el número anual de muertes certificadas por candidiasis en Inglaterra y Gales en un periodo de 34 años. En Estados Unidos el número de muertes atribuidas a candidiasis se inicia entre el periodo de 1960 a 1970, los records de muertes en Francia y Japón no comenzaron sino hasta 1968 y en Francia el incremento se da dentro de los años 1970 a 1980 [11]

Cuadro 5.- Muertes por candidiasis por millón en la población

Periodo	Inglaterra/Gales	Francia	Japón	E. U.
1968-1970	0.26	0.52	0.58	0.62
1971-1973	0.27	0.49	0.56	0.75
1974-1976	0.29	0.71	0.37	1.01
1977-1979	0.27	0.85	0.29	1.04
1980-1982	0.15	1.12	N.D.	N.D.

ND = Dato no demostrado

El Cuadro 5 muestra los porcentajes de muerte por candidiasis por millón de la población en cuatro países. Los datos de los orígenes enlistados en el Cuadro anterior fueron divididos entre la media estimada de la población anual en la estadística de cada país, determinándolos del libro "United Nations Demographic Year book Series". Los datos son expresados como la media anual de muertes por millón en cada intervalo de 3 años. [11]

Tres grandes muestreos en USA. Arrojan datos sobre los diagnósticos de candidiasis en hospitales de localidades distantes de 1970, 1976, 1980-82 de las estadísticas en todos los 3 muestreos Reingold y col. en 1980 calculó una incidencia de candidiasis por un millón de la población en USA. De 1.7 en 1970, 1.8 en 1976 y 2.6 en 1980-82 y predijo un periodo de muertes por candidiasis en los inicios de 1980 de 261-265 por año. [41]

Estudios realizados tanto en Estados Unidos, Europa y África, son trabajos atribuidos a investigadores como Saballs y col. Torres Rodríguez y col. en 1997 demuestran que, si bien es claro que la prevalencia en los aislamientos del tipo B está aumentando, los resultados no siempre concuerdan y varían de un laboratorio a otro (de 0 a 75% de las cepas aisladas). Muchos de estos estudios se han confinado a la determinación del biotipo oral predominante en pacientes con SIDA.[3]

Marlen Campos y col. en 2003 realizaron un estudio en Costa Rica; con el **Cuadro 6**, se ejemplifica el número de casos presentados en el Hospital Nacional de niños en donde encontraron que para *C. albicans* en el año de 1997, se presentó la mayor cantidad de aislamientos con un total de 307, de los cuales 94 fueron obtenidas de sangre. *C. parasilopsis*, presentó un aumento de los aislamientos para el año 2001 con un total de 55, de los cuales 26 provenían de hemocultivos de neonatos. En el caso de *C. tropicalis* para el periodo de 1996 se presentaron 77 aislamientos, con un total de 43 identificaciones de hemocultivos de neonatos. En lo referente a las otras especies de *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*) debe mencionarse que la mayoría de sus aislamientos se realizaron en muestras diferentes a sangre, tales como peritoneales, traqueales, oído, orina y otras. [35]

Cuadro 6.- Aislamientos de especies de *Candida* en pacientes pediátricos. Hospital nacional de niños, Costa Rica 1995-2001 [35]

Año	C. albicans (74%)	C. parasilopsis (8%)	C.tropicalis (12%)	Otras especies (6%)
1995	261	29	30	7
1996	240	7	77	9
1997	307	0	9	16
1998	181	24	29	5
1999	148	32	39	23
2000	182	28	36	21
2001	255	55	32	39

Otras Especies= *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. lusitaniae*

2.12 Antecedentes de la 5-Fluorocitosina

Desde el descubrimiento de las propiedades antifúngicas de la 5-Fluorocitosina y de la baja toxicidad de la misma a las células de mamíferos muchos estudios han sido orientados hacia el espectro de la actividad de este producto particularmente contra especies de *Candida*. El descubrimiento por Hasenclever y Mitchell en 1961 de dos serotipos A y B en especies de *Candida albicans* fue seguido de estudios epidemiológicos que demostraron una estrecha relación entre el serotipo de la levadura y la susceptibilidad a la droga, en general el serotipo A son sensibles a la 5-Fluorocitosina y el serotipo B son resistentes[1]

Aún cuando el espectro antifúngico de la 5-fluorocitosina es limitado hacia *Candida*, muchos aislamientos de *C. albicans* son inhibidos en su crecimiento in vitro por la 5-Fluorocitosina en concentraciones de entre 0.1 – 2.0 mg, sin embargo, la fluorocitosina es uno de los agentes antifúngicos que sufre serios problemas en cuanto a resistencia.

Esto ocurre con todos los organismos sensibles a la droga, con aislamientos definidos como resistentes, teniendo concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 5 – 25 mg durante o con tratamiento previo.[1][4]

La proporción de los aislamientos resistentes a la 5-Fluorocitosina por contacto previo con la droga difieren de un organismo a otro, cerca del 10 % de 8000 aislamientos de *C. albicans* colectados en todo el mundo fueron resistentes a la droga, sin embargo se han detectado significantes diferencias intercontinentales en un rango de 6.9% de 5000 aislamientos en Europa, a un 23.4 % de 1400 casos en Norte América. La gran prevalencia del biotipo B en los aislamientos en Norte América se ha mantenido en aumento por el alto grado de resistencia a la 5-Fluorocitosina en este continente. Cerca del 50 % de los casos probados por Stiller y col. en 1982 fueron biotipo B y 29.6 % de estos fueron resistentes comparados con un 6.9 % de biotipo A [4][26][28]

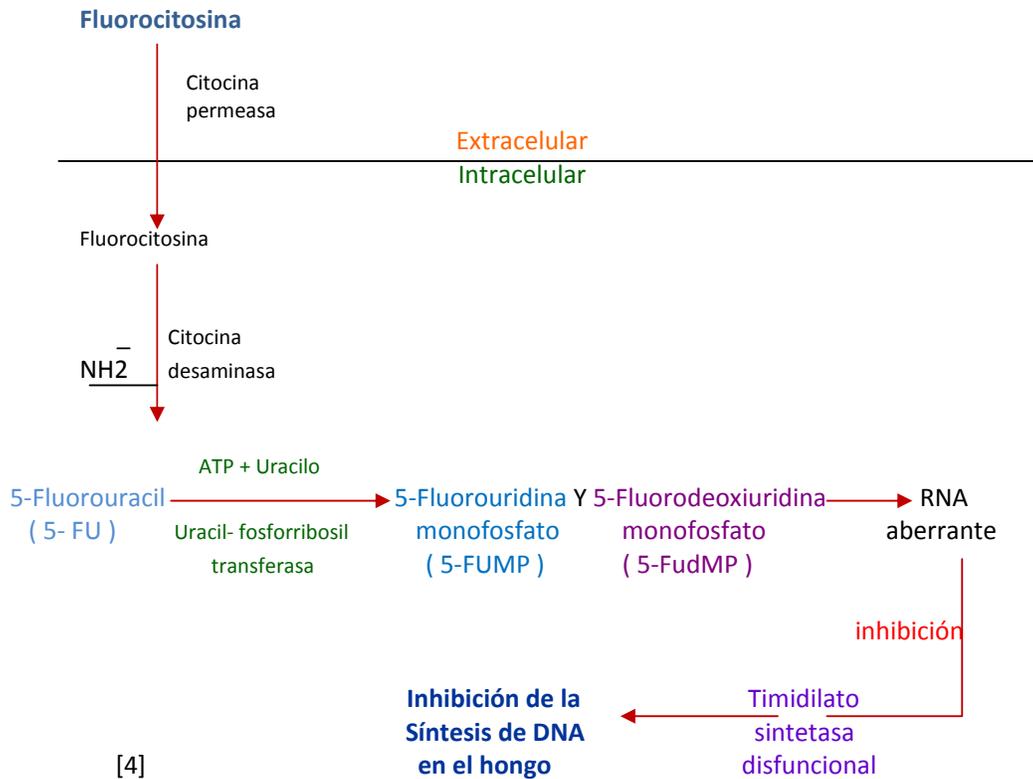
La adquisición de la resistencia a la droga ha sido la mayor causa de la falla en la terapéutica y en la recaída de los pacientes tratados con fluorocitosina, es por esto que se ha optado por la combinación de la droga con amfotericina B con lo que se ha observado disminución en el grado de resistencia. [4][23][24]

2.13 Farmacodinamia de la 5-Fluorocitosina

Como se sabe, muchos compuestos inhiben la síntesis macromolecular en el hongo, pero solamente la fluorocitosina ha sido desarrollada para el uso clínico, ésta es transportada al interior de las células fungales por la citocina permeasa, una enzima responsable de la captación de adenina, guanina e hipoxantina y citocina. Una vez que incide en la célula la fluorocitosina es desaminada a 5 – fluorouracil (5 FU), la citocina desaminasa es una enzima crítica porque a menos que la fluorocitosina sea convertida a 5 – FU, el efecto antifungal no es obtenido. La ausencia de esta enzima en las células mamíferas ha sido considerada como una de las razones más importantes para que la fluorocitosina tenga baja toxicidad en los humanos. La 5-FU es convertida a 5 –fluorouridina monofosfato (5-FUMP) y 5 – fluorodeoxiuridina monofosfato (5FudMP), esto conlleva a la formación de un precursor de un RNA aberrante por lo que éste será un potente inhibidor de la timidilato sintetasa y en consecuencia de la síntesis de
DNA.

La **Figura 7** ejemplifica el mecanismo de acción de la 5-Fluorocitosina dentro de la levadura [4]

Figura 7.-Mecanismo de acción de la 5-Fluorocitosina



Los mecanismos moleculares de resistencia a la fluorocitosina en las levaduras pueden resultar de cualquier falla para metabolizar la droga a 5 – FUMP y 5- FudMP, y en una baja en el mecanismo de la retroalimentación en la biosíntesis de la pirimidina. La resistencia intrínseca en el hongo resulta predominantemente de un defecto en la citocina desaminasa. Esto es contrastante con la adquisición de la resistencia de *C. albicans* lo cual generalmente resulta de un defecto en la uracil-fosforribosil-transferasa, una enzima involucrada en la síntesis de los compuestos 5- FudMP y 5FUMP y del uridilato en la vía de captación de la pirimidina. Whelan y Kerridge establecen importantes diferencias entre las candidas aisladas parcialmente resistentes y la alta resistencia de algunas. Los aislamientos parcialmente resistentes tuvieron niveles intermedios en la actividad de la uracil- fosforribosil transferasa entre los altos niveles de los aislamientos de cepas sensibles y los bajos niveles de cadenas completamente resistentes. [4][5][7]

La pérdida de la enzima citocina permeasa no es común en *C. albicans*. La diferencia en la importancia relativa de lesiones específicas en la resistencia intrínseca y adquirida es interesante y aún no existe explicación para esto. En *C. glabrata*, la inducción de la resistencia a la fluorocitosina por UV resulta en la aparición de cepas defectuosas en la citocina permeasa, citocina desaminasa y uracil – fosforribosil transferasa aproximadamente en un rango de 1:1:1. En contraste en *C. albicans*, la citocina permeasa es específica para la citocina y fluorocitosina en *C. glabrata* mientras que las purinas son transportadas por diferentes permeasas, esto es una evidencia de que existen sistemas de alta y baja afinidad en *C. glabrata*, sin embargo el último podría ser un factor de pasividad cruzada en la membrana. No existe similitud en la secuencia de las citocinas permeasas de *C. albicans* y de *C. glabrata*. [4][5][7]

Estudios recientes demuestran que, cepas deficientes de uridina permeasa (y por lo tanto resistentes a 5-Fluorouridina) en *C. albicans* son menos patogénicas en ratones, lo cual fue confirmado por Polak en un modelo de candidosis vaginal. Esto podría reflejar que la resistencia en los aislamientos clínicos de especies de *Candida*, resultan de reducir la virulencia en cepas resistentes, lo cual provee un nuevo y amplio campo para la realización de futuras investigaciones. [23][44]

2.14 Técnicas Empleadas en la Biotipificación

Las pruebas empleadas para la identificación de levaduras basadas en las diferencias antigénicas entre especies han sido propuestas y descritas por muchos años. El sistema comercial *Candida Check* puede ser utilizado como prueba serológica única o en conjunción con otras pruebas bioquímicas. Los antisueros compatibles pueden ser usados para detectar las levaduras y todavía aún para diferenciar especies de *Candida* entre los tejidos mediante procedimientos de inmunofluorescencia. Otro antiguo procedimiento identifica las levaduras por detección de la actividad enzimática en la totalidad de la célula y ha sido implementado comercialmente en la forma de un sistema de identificación de levaduras sin embargo existen problemas con la exactitud de éste método. [8][11]

Otros métodos para la detección incluye la restricción de fragmentos largos del DNA polimórfico de *C. albicans*, análisis cromatográfico de gases de metabolitos de las levaduras, aislamiento de las levaduras por una gran variedad de inhibidores químicos, tinciones diferenciales e inhibición de las colonias en un medio conteniendo verde de Janus, cambios en el color de las colonias al agregar una gota de solución de sales de diazonio, diferenciación electroforética de isoenzimas de *Candida*, formación de hifa, reconocimiento diferencial de las características después de la irradiación ultravioleta. Como se ha visto los métodos de biotipificación usados son diversos y han incluido la aglutinación en tubo de Hasenclever, una técnica de aglutinación en portaobjetos la cual es una modificación por el método de Hasencelver, biotipificación con antisuero factor 6, un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con el anti A, anticuerpos monoclonales los cuales han mostrado gran correlación con el biotipo. [2][11]

Una buena caracterización fenotípica de *C. albicans* es teóricamente posible sobre las bases de una combinación de diversas pruebas en las cuales se conocen varias cepas dando diferentes resultados. En la práctica sólo 3 sistemas se han desarrollado específicamente para la diferenciación de cepas en un contexto epidemiológico, y sólo dos de éstos se han aplicado a problemas epidemiológicos en más de una escala preliminar, estos involucran pruebas con crecimiento controlado de una *C. albicans* "desconocida" en placas con agar, con una cepa de referencia estandarizada. [11][22]

El sistema "Resistograma" realizado por Warnock y col. en 1982 involucra pruebas de resistencia de *C. albicans* hacia 6 diferentes químicos, los cuales son referidos por las letras A hasta la F, y los biotipos se describen en términos de éstos químicos ante los que es resistente *C. albicans*. [22][43]

El sistema de Biotipificación de Odds y Abbott, se basa en 9 pruebas, las cuales incluyen reacciones de asimilación, resistencia a inhibidores químicos y detección de proteasas, en este sistema los biotipos se describen con códigos de 3 dígitos derivados de la asignación dada por el resultado de la prueba. Ambos sistemas de biotipificación son conceptos simples en concepto y ejecución, pero representan problemas en cuanto a la estandarización de éstas. Por lo tanto el uso de estas pruebas aún no se aplica a la rutina del laboratorio sino que su uso se restringe a trabajos de investigación.[21]

Un sistema de biotipificación para *C. albicans* y otras especies se basa en la diferenciación de cepas por la susceptibilidad de las levaduras a factores de asenamiento pero no han sido utilizados en investigaciones epidemiológicas. Aún cuando de manera localizada se ha empleado la 5-FC. [11]

2.15 Sensibilidad de *Candida albicans* a agentes antifúngicos

La creciente incidencia de infecciones por levaduras, el incremento de fármacos antifúngicos y la aparición de resistencias a éstos ha llevado a los laboratorios de microbiología clínica a la necesidad de conocer la sensibilidad antifúngica de sus aislamientos. [6][23][34]

Los ensayos in vitro de sensibilidad antifúngica son problemáticos por los factores que pueden influir en su resultado, tales como el tipo de microorganismo, el tamaño del inóculo, el medio empleado, las condiciones de incubación y el método de lectura e interpretación.[5][34]

Así mismo, la laboriosidad de los métodos de referencia propuestos por el CLSI para la realización de las pruebas de sensibilidad in vitro a los distintos antifúngicos hace difícil su incorporación a la rutina del laboratorio. [34]

Estudios más recientes de sensibilidad in vitro de los biotipos A y B realizados por Mendoza y col. en 2006 [34] frente a otros antifúngicos como el ketoconazol, itraconazol y bifonazol, encontraron que el biotipo A era más sensible que el B a los imidazoles (bifonazol y ketoconazol). Velegraki en 1995 [2] estudió 78 muestras orofaríngeas obtenidas de individuos severamente inmunocomprometidos, donde el biotipo B mostró valores de concentración mínima inhibitoria significativamente elevados frente al itraconazol y fluconazol, cuando fue comparado con el biotipo A.

No obstante, la capacidad de infección por *Candida* disminuye porque existe un equilibrio biológico con la flora comensal bacteriana. La candidiasis oral ha sido ampliamente asociada a estados de inmunodepresión y se ha establecido su valor pronóstico en el curso de la infección por VIH. El tratamiento y control de la candidiasis es importante dentro de las pautas terapéuticas del SIDA y está basado en el empleo racional de antimicóticos azólicos, principalmente de fluconazol. Aunque es indudable el valor terapéutico de los antifúngicos azólicos, en los últimos años se han observado episodios de candidiasis orales que no respondían adecuadamente a este tratamiento y se han descrito aislamientos clínicos de *Candida* que eran resistentes in vitro a ketoconazol, fluconazol y/o itraconazol. Por otra parte, no se ha establecido si la patogenicidad de los aislamientos y su relación con la manifestación clínica de la infección tiene relación con una menor sensibilidad in vitro a los antifúngicos empleados. [26][30][33]

Se puede hablar de cuatro generaciones de fármacos en el tratamiento contra *Candida*. La primera generación tiene como representante más significativo el violeta de genciana que aparece en 1935 y es el más empleado hasta 1955. La segunda generación de agentes está constituida por una miscelánea de productos; en 1947 aparece una combinación de ácido propiónico con procaína sódica y cálcica; en 1953 hace aparición un antibiótico fungicida, la candidina. La nistatina es el representante más importante de la tercera generación. Aparece en 1955; hasta la introducción de los imidazoles se ha considerado el agente más eficaz. Dentro de esta generación se encuentra también el ácido bórico y el sorbato potásico. La cuarta generación queda constituida por los imidazoles. El primero fue el nitrato de miconazol en 1971 y casi al mismo tiempo el clotrimazol. El ketoconazol es un derivado imidazólico oral que aparece en 1979. Recientemente se han desarrollado nuevos imidazoles de mayor espectro y posología más cómoda. [32][38]

En la actualidad contamos con diversos agentes fungicidas de acción local y sistémica, La clasificación de acuerdo con su mecanismo de acción los colocan en antifúngicos que actúan sobre la integridad física de la membrana, los derivados poliénicos (amfotericina B y nistatina) y aquellos que bloquean la síntesis del ergosterol en la membrana celular, los derivados imidazoles (diazoles: ketoconazol, bifonazol, clotrimazol, miconazol, tioconazol; y triazoles: fluconazol e itraconazol). Además de estas acciones específicas se ha descrito recientemente que los antifúngicos inhiben la transformación levadura-micelio en *C. albicans*. [6][32][38]

Existen otros métodos colorimétricos como el sistema "Sensititre Yeast One" que se basa en una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa que contiene un indicador de pH (azul Alamar) que permite determinar la sensibilidad in vitro de forma cuantitativa y por medio de un cambio colorimétrico a cinco antifúngicos (amfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y 5-fluorocitosina). Es un método poco laborioso, estandarizado y con un gran paralelismo con respecto al método descrito en el documento M27-A del CLSI en referencia a una gran mayoría de variables experimentales. En la práctica, puede ser utilizado para la determinación de la sensibilidad tanto de levaduras como de hongos filamentosos. [31]

El "ASTY colorimetric panel" es un sistema de determinación de la sensibilidad en tiras de pocillos que contienen previamente deshidratadas las concentraciones de antifúngico a ensayar. Cuatro son los antifúngicos de trabajo (amfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol), en rangos de concentración similares a los utilizados en el método de microdilución del CLSI de referencia. [31]

El sistema "Fungitest" consiste en una galería con pocillos que incorporan concentraciones discriminantes para conocer la sensibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol 5-Fluorocitosina y miconazol. Los pocillos se inoculan con suspensiones de 103 UFC/mL. El método utiliza RPMI 1640 como medio de cultivo perola determinación de la sensibilidad, a diferencia del anterior y del método de referencia, es cualitativa no cuantitativa.[31]

En el **Cuadro 7** se muestran los porcentajes de concordancia entre diferentes métodos para la identificación de *C. albicans*[31]

Cuadro 7.-Porcentaje de Concordancia entre los diferentes métodos comercializados para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos y el método de referencia M27-A de la CLSI.

Organismo	Antifúngico	Sensititre Yeast One 24 -48H	Fungitest 24 – 48H	ASTY 24 – 48H
<i>Candida albicans</i>	AMB	97 - 97%	100% – nd	99 – 99%
	5-FC	87 – 56%	98% – nd	92 – 98%
	ITZ	89 – 54%	98% – nd	91 – 96%
	FLZ	87 – 60%	94% – nd	95 – 95%
	KTZ	90 - 56%	88% – nd	nd – nd

AMB= anfotericina B

FLZ= fluconazol

KTZ=Ketoconazol

5-FC= 5-fluorocitosina

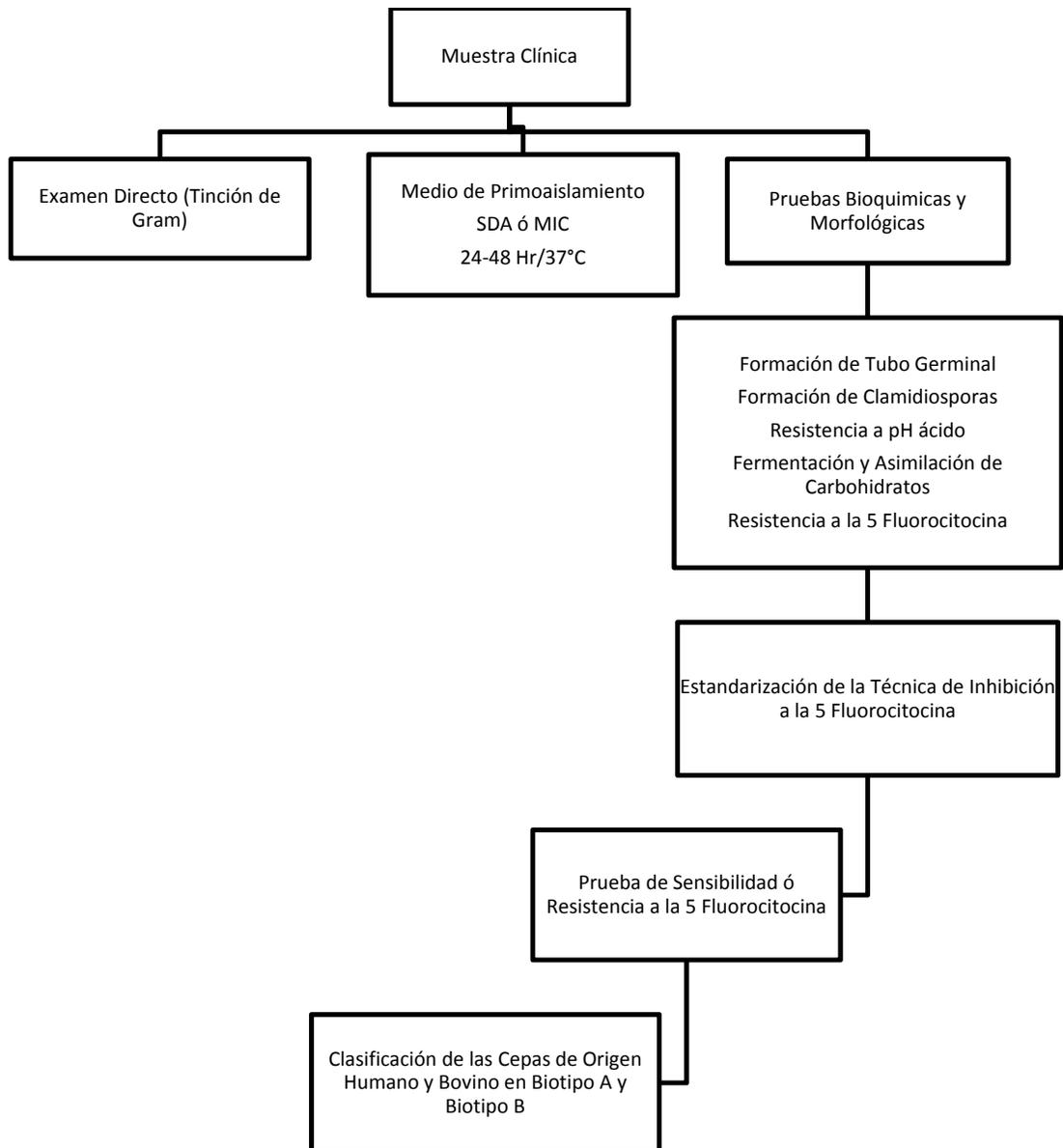
MCZ= Miconazol

Nd= no determinada [31]

2.16 Diagrama de flujo metodológico

A continuación se plantea en la **Figura 8**, el proceso a seguir durante nuestro estudio para biotipificar cepas de *Candida albicans* mediante la técnica de 5-Fluorocitocina.

Figura 8. Diagrama de flujo metodológico



3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se trabajó con las siguientes muestras

3.1 Muestras de origen Humano colectadas a partir de:

Orofaríngea	39 Cepas
Vaginal	28 Cepas
Urocultivo	12 Cepas
Uretral	9 Cepas

Cépas pertenecientes al cepario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán cátedra de micología médica

Muestras de origen animal colectadas a partir de Bovinos:

Mastitis	50 Cepas
-----------------	----------

Se trabajaron un total de 138 Cepas

Aspectos Considerados en los pacientes Humanos:

Sexo
Edad
Origen
Espécimen Clínico

3.2.- Examen directo. Tinción de Gram [14]

Objetivo.

Se realiza la tinción para reconocer las levaduras características de este género, las cuáles fijan en su pared celular el colorante Cristal Violeta dando una tonalidad violeta a las mismas.

Colorantes y Reactivos

Solución de Cristal Violeta.

Solución A

- Cristal Violeta 2.0 g
- Alcohol Etilico 30 mL

Solución B

- Oxalato de amonio 0.8 g
- Agua Destilada 20 mL

Se diluye la solución A al 10% en agua destilada y se mezcla con igual volumen de la solución B

Solución de Lugol

- Yodo 1.0 g
- Yoduro de Potasio 2.0 g
- Agua Destilada 200 mL

Solución Decolorante

- Alcohol Etilico de 95°

Solución de Contraste Fucsina Básica

- Fucsina Básica 0.10 g
- Agua Destilada 100 mL

Este Método divide a las bacterias en Gram Positivas y Gram Negativas. Al colorear las levaduras con Cristal Violeta y añadirles una solución débil de yodo (Iugol) se combinan estos con algunos componentes de la célula que son retenidos por la membrana citoplásmica, cuando se tratan por alcohol, otras en cambio liberan rápidamente el colorante por lo que no aparecerían a la visión microscópica a no ser que se les contratiñera con algún otro tinte biológico como la Safranina o la Fucsina. Por lo tanto los microorganismos que conservan el Cristal Violeta (Gram Positivas) se observan de Azul – Violáceo y las que no lo hacen (Gram Negativas), muestran un color que corresponde al utilizado en el contraste, o color de rosa para la Safranina o rojo para la Fucsina. En las levaduras las células se tiñen de color Violeta. [14]

Procedimiento de la Tinción de Gram.

1. Preparar el frótis y fijarlo al calor
2. Cubrir la preparación fijada con la solución de cristal Violeta durante un minuto
3. Lavar con agua
4. Cubrir el frótis con Iugol por un minuto
5. Decantar el Iugol
6. Decolorar con alcohol – acetona
7. Lavar rápidamente con agua
8. Contrastar con la solución de Fucsina básica o Safranina por un minuto
9. Lavar con agua, secar al aire y examinar con objetivo de inmersión

3.3.- Cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) [14]

Objetivo.

Realizar el aislamiento de la levadura de manera satisfactoria y obtener colonias puras.

Medio Agar Dextrosa Sabouraud

Formula en gamos por litro.

- Mezcla de Peptonas 10.0 g
- Dextrosa 40.0 g
- Agar 15.0 g

Preparación.

Suspender 65 g. del medio deshidratado en un litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 minutos Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto, esterilizar a 121° C a 15 lb. Y 15 minutos en autoclave.

3.4.- Prueba de Tubo Germinativo [14]

Objetivo.

Se realiza como una prueba rápida de identificación de la especie del género *Candida*.

Preparación.

- Se suspende una pequeña porción de la colonia aislada de la levadura en estudio en un tubo de prueba con 0.5 mL. de suero humano o de conejo.
- Se incuba el tubo de prueba a 37° C por no más de 2 hr.
- Se coloca una gota de la suspensión suero-levadura en un portaobjeto y se pone el cubreobjetos, examinando con el microscopio en busca de los tubos germinales, la prueba no es válida si se examina después de las 2 hr.
- Cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* pueden usarse como controles positivo y negativo, respectivamente.

3.5- Producción de Clamidioconidias [14]

La especie *albicans* tiene la habilidad de formar esporas esféricas de doble pared llamadas clamidioconidias, constituyendo una prueba diferencial entre las especies del género *Candida*, éstas clamidioconidias pueden ser inducidas a su formación en medios específicos, tales como: Agar clamidioconidia, Agar Czapeck Dox, Agar harina de maiz (Corn Meal), adicionando a los 2 últimos Tween 80 a una proporción de 1%

Agar Czapeck Dox y Tween 80

Fórmula en gramos por litro:

- Agar Czapeck Dox 50 g
- Agua Destilada 1000 mL
- Tween 80 (Polisorbato 80) 10 g

Preparación

Suspender 50 g del medio deshidratado en 1000 mL de agua destilada y mezclar agitando vigorosamente.

- Adicionar 10 mL de Tween 80, mezclar y agitar.
- Calentar con agitación frecuente por espacio de 1 minuto
- Esterilizar en autoclave a 121°C / 15 lb / 15 minutos
- pH final 7.5
- Enfriar y vaciar en cajas petri

3.6 Técnicas de sembrado utilizadas para la producción de Clamidioconidias[14]

a) Técnica de picadura.- En cajas petri de 5 cm de diámetro, estériles se vacían aproximadamente 12 mL del medio a utilizar, se espera a que solidifique para luego sembrar la cepa a probar, esto se hace teniendo el asa en forma de L y tomando una asada de la colonia , introduciendo el asa al medio y rasgando el agar a lo largo de la caja petri, se deja incubar a 37° C, se revisa diariamente al microscopio, para observar el desarrollo de las clamidioconidias.

b) Técnica de Sándwich.- En una caja petri estéril se vierten de 10 mL del medio a utilizar, se espera a que solidifique, sembrando posteriormente sobre la superficie del agar, cubriéndose el sembrado con otro cubreobjetos limpio y desengrasado. Dejar incubando a 37° C y observar diariamente las cajas para observar el desarrollo de las clamidioconidias.

3.7 Prueba de tolerancia a pH ácido[14]

Para identificación presuntiva de *Candida albicans*

La eficacia de la tolerancia a pH´s ácidos de *C. albicans* se ha demostrado sólo en aislamientos de especies de levaduras comúnmente encontradas en muestras clínicas. En ocasiones aislamientos de especies menos comunes pueden dar resultados falsos positivos

La prueba de la tolerancia a pH´s ácidos, ayuda a diferenciar a *C. albicans* de otras especies, pues se ha encontrado que el rango de pH de 1.2 a 1.5 es conveniente para el desarrollo de *C. albicans* ya que a pH mayores pueden crecer *Candida spp.*

Agar para la prueba de pH ácido

Solución A:

- Caldo Czapeck Dox 50 g
- Agua destilada 1000 mL

Procedimiento

Disolver el agar en 1000 mL de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121° C/15 lb/15 minutos

Solución B

- Fosfato de sodio 9.438 g
- Fosfato de potasio 9.073 g
- Dextrosa 10.0 g
- Agua destilada 1000 mL

Nota: se ajusta el pH deseado con HCl 1N con ayuda de un potenciómetro.

Se disuelven los fosfatos y la dextrosa en 1000 mL de agua destilada. El pH se ajusta con HCl al pH deseado con ayuda del potenciómetro, la solución final se esteriliza por filtración en filtro Millipore 0.22µ

Finalmente se mezclan la solución A y B en la siguiente proporción: por cada 180 mL de A adicionar 20 mL de B, el medio se vacía en tubos de ensaye. Se deja en estufa bacteriológica a prueba de esterilidad por 24 hr.[11]

3.8- Asimilación y Fermentación de Carbohidratos [14]

Estas pruebas se consideran importantes para lograr la diferenciación del género y especie de *Candida*, para cada prueba realizada para la identificación se utilizaron cepas de referencia *C.albicans* ATCC 10232 como control positivo y *C. krusei* como control negativo.

La prueba de **Fermentación de carbohidratos** es comúnmente utilizada para la identificación de levaduras sin embargo, esta prueba es menos variable y son menos dependientes que las pruebas de Asimilación de carbohidratos. La única real evidencia de la fermentación de carbohidratos por las levaduras es la producción de gas por lo que, la utilización del tubo Durham es indispensable. [14]

Medio Utilizado.

Caldo Peptona, carbohidratos y rojo de Fenol; es un medio similar al agar Dextrosa al cual se le ha agregado rojo de fenol como indicador de pH. [14]

Formula en gramos por litro:

Mezcla de peptonas	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Carbohidrato	10 g
Rojo de Fenol	0.025 g
pH	7.4

Preparación:

Disolver la mezcla de peptonas en el agua destilada, adicionar cloruro de sodio y mezclar bien, se añade el carbohidrato, finalmente agregar rojo de fenol. Esterilizar en autoclave 115° C 10lb, 10 mn.

Servir el medio en tubos de ensayo, aproximadamente 8 ml por tubo conteniendo campana Durham para la detección de la producción de gas. *Candida albicans* es inoculada incubando a temperatura de 37° C por espacio de 10 a 15 días. [14]

Interpretación:

Una prueba positiva se observa con una burbuja de aire recolectada en la campana Durham lo cual indica producción de gas, en algunas ocasiones se puede apreciar acidificación del medio por el cambio de color de púrpura a amarillo. [14]

Un cambio de color en el medio sin producción de gas es indicativo de contaminación bacteriana.

Asimilación de carbohidratos [14]**Formula del medio basal en gramos por litro:**

Azul de bromotimol	0.16 g
Agar bacteriológico	20.0 g
Solución buffer de fosfatos	100.0 mL

Procedimiento:

Disolver el agar en el agua destilada, adicionar la solución buffer y el indicador.

Esterilizar por autoclave a 121° C, 15 lb, 15 mn.

Se deja enfriar y se agrega la solución del carbohidrato a probar. Inocular el medio y dejar incubar 4 días a 37° C. [14]

Adición del azúcar.

Asépticamente se adiciona el azúcar a partir de una solución stock esterilizada por filtración.

La Glucosa, Lactosa y Sacarosa se adicionan a una concentración final del 1%, mientras que la Maltosa, Galactosa, Melodiosa, Celobiosa, Inositol, Xilosa, Rafinosa, Trealosa, y Dulcitol a una concentración final de 0.5%. [14]

Cuadro 8. Pruebas de Asimilación (Auxonogramas) y Fermentación (Zimogramas) de elementos de carbono para *C. albicans*[15]

Prueba	Carbohidratos	Resultado
AUXONOGRAMA	D-glucosa	(+)
	Maltosa	(+)
	Sacarosa	(+)
	D-galactosa	(+)
	Lactosa	(-)
	Rafinosa	(-)
	Inositol	(-)
	Celobiosa	(-)
	D-xilosa	(+)
	Trealosa	(+)
	L-arabinosa	V
	Adonitol	V
	2-ceto-gluconato	(+)
	Metil-D-glucosido	(+)
	Melezitosa	V
	N-acetilglucosamina	(+)

Prueba	Carbohidratos	Resultado
ZIMOGRAMA	D-glucosa	(+)
	Maltosa	(+)
	Sacarosa	V

(+) Positivo
(-) Negativo
V Variable

3.9 Estandarización de la Prueba de Sensibilidad o Resistencia a la 5-Fluorocitosina

Preparación de las concentraciones de 5-Fluorocitosina.

La preparación de las concentraciones de 5-Fluorocitosina se realizó partiendo de un valor de 500 mg del principio activo con una presentación comercial del antimicótico en cápsulas, las cuáles fueron donadas por el Dr. Roberto Arenas del departamento de dermatología del hospital general "Manuel Gea González".

Cálculos de Concentración de 5-Fluorocitosina

Se realizaron 11 diluciones en un volumen final de 100 mL cada una, para las cuáles se determinaron las siguientes concentraciones de 5-Fluorocitosina.

Una vez obtenido el valor de miligramos necesarios para cada dilución se realizó el cálculo de concentración para las 11 diluciones de la siguiente manera:

Preparación

Primero se consideró que el valor inicial de 500 mg de 5—Fluorocitosina por cápsula sería igual a 500,000 µg/mL del principio activo, el cual estaría disuelto en un volumen de 100 mL

Se disolvieron 500 mg del principio activo (una cápsula) en 100 mL de agua destilada (solvente recomendado por la Farmacopea) para tener una concentración de 500,000 µg/mL.

De la solución anterior se tomaron 10 mL y se llevaron a un volumen de 100 mL en matraz aforado para entonces tener una segunda solución cuya concentración fuese de 5000 µg/mL, de ésta se tomaron 10 mL aforándose nuevamente a un volumen de 100 mL para tener una concentración de 500 µg/mL, a esta solución se le llamó **solución A**

La **solución A** fue la solución madre a partir de la cual se obtuvieron las diferentes concentraciones de 5- Fluorocitosina a trabajar determinándose los siguientes valores:

10 µg/mL
20 µg/mL
25 µg/mL
30 µg/mL
40 µg/mL
50 µg/mL
60 µg/mL
70 µg/mL
80 µg/mL
90 µg/mL
100µg/mL

Las concentraciones anteriores fueron considerados así para caer dentro del rango establecido por Hasenclever y Mitchel en cuyo estudio las concentraciones para la 5-Fluorocitosina van de 10 – 100 µg/mL. [11][19]

NOTA: Todas las soluciones fueron filtradas posterior a la preparación, en membrana estéril de 0.22 µ de poro y recuperadas bajo las mismas condiciones de esterilidad.

3.10.- Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 5-Fluorocitosina

Se utilizaron placas con Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) con la finalidad de implementar un medio basal constituido de los mínimos nutrientes para el desarrollo de las levaduras de *Candida albicans*; a éste medio se le adicionaron concentraciones de 5-Fluorocitosina de 10µg/mL, 20µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL respectivamente, utilizando dos placas por cada valor de concentración de 5-Fluorocitosina.

3.11- Preparación de los medios con 5-Fluorocitosina

Se pesan 37 g del medio SDA deshidratado y se suspenden en un litro de agua destilada dejándose remojar aproximadamente de 10 – 15 min. Se calienta agitando fuertemente hasta la completa disolución y se deja hervir durante un minuto. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121° C durante 20 mn y al sacar se deja enfriar a temperatura de 45-50° C

Ya en área estéril, previo a la adición del medio, se adiciona un volumen de 10 mL de cada concentración de 5-Fluorocitosina de manera estéril tratando de flamear tanto la boca del matríz o recipiente que contenga al antimicótico, una pipeta graduada se destina para cada concentración, una vez tapada la caja petri, se agita con movimientos circulares en ambas direcciones en una superficie totalmente plana.

Se deja solidificar el medio y se meten a prueba de esterilidad en estufa bacteriológica a 37° C durante 24 hr.

3.12- Sembrado de las placas con 5-Fluorocitosina y determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

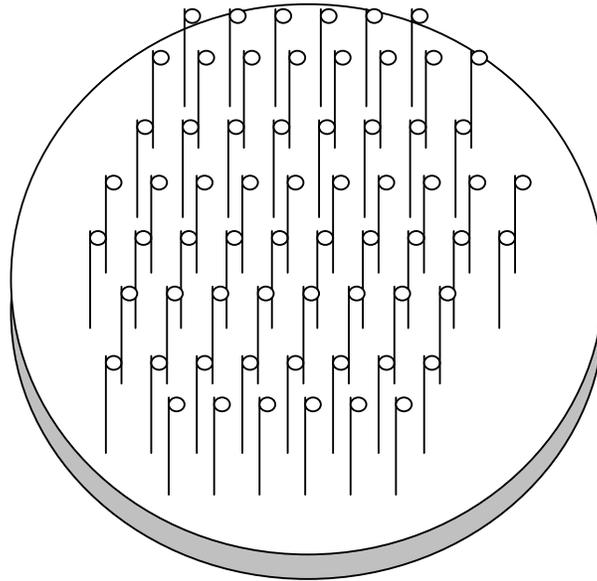
Para realizar el sembrado de las diferentes cepas de *C. albicans* se requirió de implementar una técnica nueva, esta técnica permitió inocular un gran número de cepas a la vez sin requerir de un elevado costo, rápida y fácil de usar y así permitir el sembrado de las levaduras en cajas petri que se emplean comúnmente en los ensayos microbiológicos.

Esta técnica involucra la fijación de 64 asas bacteriológicas calibradas sobre una base de resina, y dispuestas de modo tal que el espacio entre cada una de ellas permitió la inoculación simultánea de hasta 64 cepas diferentes por cada caja.

El protocolo de inoculación utilizado consistió en realizar 2 inoculaciones por cada cepa de modo que por caja se sembraron 29 cepas distintas ocupando 3 espacios restantes para una cepa biotipo A y 3 para una cepa biotipo B como controles positivo y negativo respectivamente.

A continuación presentamos la **Figura 9** la cual esquematiza el multi-inoculador de 64 asas calibradas utilizado para realizar el inóculo de la levadura sobre la placa con Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y diferentes concentraciones de 5-FC.

Figura 9.- Multi-inoculador de 64 asas bacteriológicas calibradas



Una vez diseñado el multi-inoculador, se procedió a sembrar las cepas de *C. albicans* en ciclos de 29 cepas distintas, mantenidas en tubos con agar SDA incubadas durante 48 hr/37°C. en estufa bacteriológica.

Del medio SDA en tubo, se procedió a realizar una suspensión de cada una de las levaduras en 5 mL de agua estéril contenida en tubos de ensaye y ajustando al estándar 1 de Mc Farland cuya concentración es de 2.8×10^{-6} UFC/mL.

De cada suspensión de levaduras se tomaron 500 μ L con pipeta automática para depositarlos en 2 pozos/cepa de una microplaca de ELISA, de modo que se utilizaron 64 pozos. Una vez situadas en la microplaca la suspensión de levaduras se tomó por contacto con el multi-inoculador para un total de 29 cepas, las cuales fueron sembradas por contacto sobre la superficie del agar SDA con diferentes concentraciones de 5-Fluorocitosina por cada placa.

La **Figura 10** la cual se presenta a continuación demuestra como quedarían las posiciones o sitios de inoculación por contacto de la suspensión de levaduras sobre la placa de agar SDA y diferentes concentraciones de 5-FC.

Figura 10.- Esquema de inoculación de cepas de *C. albicans* sobre una placa de SDA con diferentes concentraciones de 5-FC.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A			A	A	A	B	B	B		
B		1	1	2	2	3	3	4	4	
C		5	5	6	6	7	7	8	8	
D	9	9	10	10	11	11	12	12	13	13
E	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
F		19	19	20	20	21	21	22	22	
G		23	23	24	24	25	25	26	26	
H			27	27	28	28	29	29		

Posiciones que ocupan cada una de las cepas dentro de los pozos de la microplaca para ELISA de donde fueron tomadas por contacto con el multi-inoculador para sembrarlas posteriormente en placas con SDA y diferentes concentraciones de 5-Fluorocitosina.

- A= Cepa de Referencia Biotipo A, Sensible a 5-FC,
- B= Cepa de Referencia Biotipo B, Resistente a 5-FC

3.13 Interpretación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)

La lectura de la inhibición de las levaduras en las placas de SDA y concentraciones de 5-Fluorocitosina fue después de la incubación a 37° C/48 hr. los parámetros de la asignación de crecimiento o inhibición se dieron de la siguiente manera.

- Cepa de Referencia Biotipo **A** = **Sensible**
- Cepa de Referencia Biotipo **B** = **Resistente**

Grados de Inhibición:

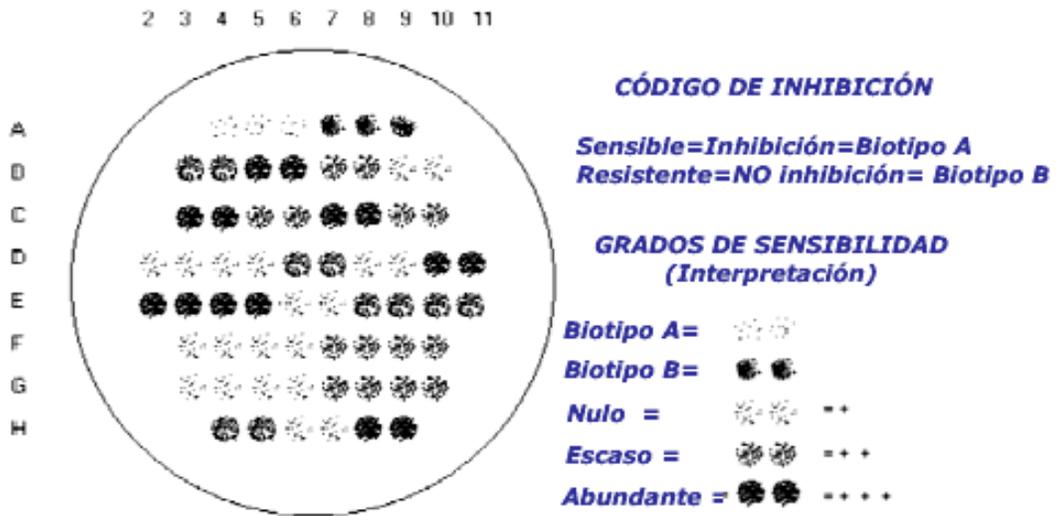
- **Sensible** = Se inhibe su crecimiento por la 5-Fluorocitosina
- **Resistente** = Crece en presencia de la 5-Fluorocitosina

Interpretación de la Colonia:

- Sensibles** = (-)
- Resistentes**
- a) Nula = (+)
- b) Escasa = (++)
- c) Abundante = (+++)

La **Figura 11** la cual se presenta a continuación demuestra el crecimiento o la inhibición de las diferentes cepas de *C. albicans* de acuerdo a las posiciones que guardan dentro de la placa con SDA y diferentes concentraciones de 5-Fluorocitosina, según su sitio de inóculo.

Figura 11.-Inhibición o crecimiento de diversas cepas de *C.albicans* en placas de agar SDA y diferentes concentraciones de 5-Fluorocitosina



El biotipo "A" no muestra crecimiento en la placa de SDA a concentraciones adicionales de 5-Fluorocitosina, simplemente se observa la mancha dejada por el inóculo de la cepa, el biotipo "B" si presenta crecimiento en el sitio de inoculación

4 RESULTADOS

De las 138 cepas estudiadas, 125 dieron resultado positivo a las pruebas de identificación para *Candida albicans*, las 13 restantes no pudieron lograrse por contaminación con bacterias haciendo imposible su purificación.

Las pruebas de Identificación fueron las siguientes:

Tinción de Gram

Formación de Tubo Germinal

Formación de Clamidioconidias

Resistencia a pH ácido

Fermentación y asimilación de Carbohidratos

De las 125 cepas consideradas como positivas, 75 fueron de origen humano y 50 fueron de origen bovino.

De las 75 cepas de origen humano el 57.4% mostraron sensibilidad a la 5-Fluorocitosina y el 42.6% resistencia al antimicótico.

De las cepas de origen bovino el 68% mostraron ser sensibles al antimicótico y el 32% ser resistentes.

Las pruebas de sensibilidad y resistencia a la 5-Fluorocitosina arrojaron los parámetros para la clasificación de *C. albicans* en los biotipos A y B.

De las 125 Cepas positivas, 48 mostraron tener crecimiento a concentraciones de 5 – Fluorocitosina de 40 µg/mL y mayores a ésta, la cual fue tomada como referencia para considerarlas resistentes; esto representa un 38.4% de las cepas estudiadas; las cepas detectadas como sensibles fueron 77 cepas, y mostraron inhibición en su crecimiento frente al antimicótico representando el 61.6 % del total, el cual está dividido en diferentes grados de sensibilidad como a continuación se presenta en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11.-Relación entre el porcentaje de *C. albicans* tanto en humanos como en bovinos sensibles a la 5-Fluorocitosina y su correspondiente concentración Inhibitoria.

N° de Cepas	Sensibilidad a la 5-Fluorocitosina	% que Representan
18	10µg/mL	14.4%
13	20µg/mL	10.4%
11	25µg/mL	8.8%
14	30µg/mL	11.2%
21	40µg/mL	16.8%
Total 77		Total 61.6%

Todos los resultados se muestran de manera más gráfica y representativa en las figuras y Cuadros siguientes.

Cuadro N° 12 Cepas de *C. albicans* obtenidas de Exudado Faringeo en pacientes Femeninos.

Número	Edad	Sensibilidad a 5-FC (µg/mL)	Biotipo
1	18	Resistente	B
2	23	Resistente	B
3	40	40µg/mL	A
4	34	Resistente	B
5	29	40µg/mL	A
6	19	Resistente	B
7	17	25µg/mL	A
8	19	10µg/mL	A
9	28	10µg/mL	A
10	30	10µg/mL	A
11	32	Resistente	B
12	22	10µg/mL	A
13	24	10µg/mL	A
14	31	25µg/mL	A
15	22	Resistente	B
16	33	30µg/mL	A
17	28	40µg/mL	A
			Total Biotipo A 11
			Total Biotipo B 6

Cuadro N° 13 Cepas de *C. albicans* obtenidas de Exudado Vaginal humano

Número	Edad	Sensibilidad a 5-FC (µg/mL)	Biotipo
1	33	10µg/mL	A
2	22	10µg/mL	A
3	41	25µg/mL	A
4	31	25µg/mL	A
5	26	Resistente	B
6	20	25µg/mL	A
7	17	30µg/mL	A
8	15	40µg/mL	A
9	23	Resistente	B
10	4	Resistente	B
11	56	30µg/mL	A
12	34	10µg/mL	A
13	34	Resistente	B
14	12	Resistente	B
15	24	10µg/mL	A
16	32	10µg/mL	A
17	22	40µg/mL	A
18	32	Resistente	B
19	42	40µg/mL	A
20	26	Resistente	B
21	25	40µg/mL	A
22	28	Resistente	B
23	48	40µg/mL	A
24	51	Resistente	B
25	19	Resistente	B
			Total Biotipo A 15 Total Biotipo B 10

Cuadro N° 14 Cepas de *C. albicans* obtenidas de Urocultivo en pacientes Femeninos.

Número	Edad	Sensibilidad a 5-FC (µg/mL)	Biotipo
1	38	10µg/mL	A
2	22	10µg/mL	A
3	18	20µg/mL	A
4	22	30µg/mL	A
5	25	Resistente	B
6	21	Resistente	B
7	30	Resistente	B
8	40	Resistente	B
9	20	30µg/mL	A
10	33	Resistente	B
			Total Biotipo A 5
			Total Biotipo B 5

Cuadro N° 15 Cepas de *C. albicans* obtenidas de Exudado Faringeo en pacientes Masculinos.

Número	Edad	Sensibilidad a 5-FC (µg/mL)	Biotipo
1	32	20µg/mL	A
2	27	40µg/mL	A
3	24	Resistente	B
4	33	Resistente	B
5	41	40µg/mL	A
6	38	10µg/mL	A
7	18	10µg/mL	A
8	29	20µg/mL	A
9	27	Resistente	B
10	25	Resistente	B
11	22	10µg/mL	A
12	46	20µg/mL	A
13	19	10µg/mL	A
14	20	30µg/mL	A
15	29	40µg/mL	A
16	50	Resistente	B
17	37	40µg/mL	A
			Total Biotipo A 12
			Total Biotipo B 5

Cuadro N° 16 Cepas de *C. albicans* obtenidas de Exudado Uretral en Masculinos.

Número	Edad	Sensibilidad a 5-FC ($\mu\text{g/mL}$)	Biotipo
1	37	Resistente	B
2	31	Resistente	B
3	22	Resistente	B
4	44	Resistente	B
5	30	Resistente	B
6	25	Resistente	B
			Total Biotipo A 0 Total Biotipo B 6

Cuadro N° 17 Cepas de *C.albicans* obtenidas de Mastitis en Bovinos

Número	Sensibilidad a 5-FC (µg/mL)	Biotipo
1	20µg/mL	A
2	Resistente	B
3	Resistente	B
4	20µg/mL	A
5	Resistente	B
6	40µg/mL	A
7	Resistente	B
8	20µg/mL	A
9	Resistente	B
10	30µg/mL	A
11	25µg/mL	A
12	30µg/mL	A
13	30µg/mL	A
14	10µg/mL	A
15	25µg/mL	A
16	20µg/mL	A
17	40µg/mL	A
18	20µg/mL	A
19	40µg/mL	A
20	40µg/mL	A
21	25µg/mL	A
22	Resistente	B
23	Resistente	B
24	40µg/mL	A
25	40µg/mL	A
26	30µg/mL	A
27	25µg/mL	A
28	20µg/mL	A
29	30µg/mL	A
30	25µg/mL	A
31	20µg/mL	A
32	40µg/mL	A
33	20µg/mL	A
34	40µg/mL	A
35	30µg/mL	A
36	Resistente	B
37	30µg/mL	A
38	Resistente	B
39	Resistente	B
40	Resistente	B
41	Resistente	B
42	Resistente	B
43	40µg/mL	A
44	Resistente	B
45	40µg/mL	A
46	20µg/mL	A
47	Resistente	B
48	Resistente	B
49	30µg/mL	A
50	10µg/mL	A
		Total Biotipo A 35 Total Biotipo B 15

Figura 12.-Porcentaje de cepas de *C. albicans* por población muestreada



Figura 13.- Comparación entre la sensibilidad y resistencia de cepas de *C. albicans* frente a la 5-Fluorocitosina en las tres poblaciones,

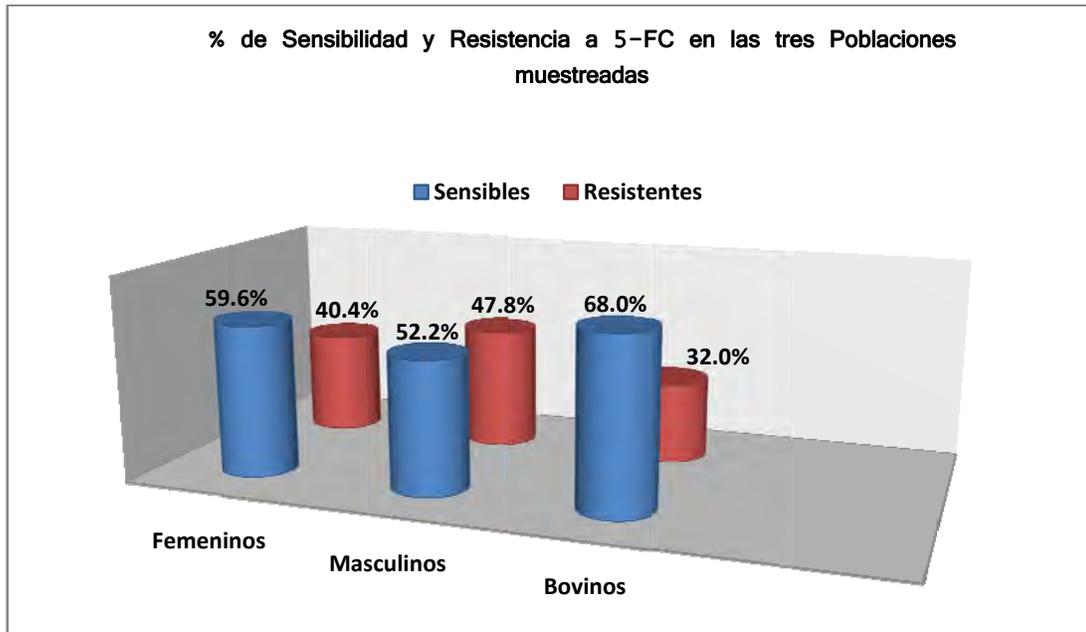


Figura 14.- Relación entre el porcentaje de sensibilidad a la 5-Fluorocitosina y las Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en cepas de pacientes masculinos y femeninos a partir de exudado faríngeo.

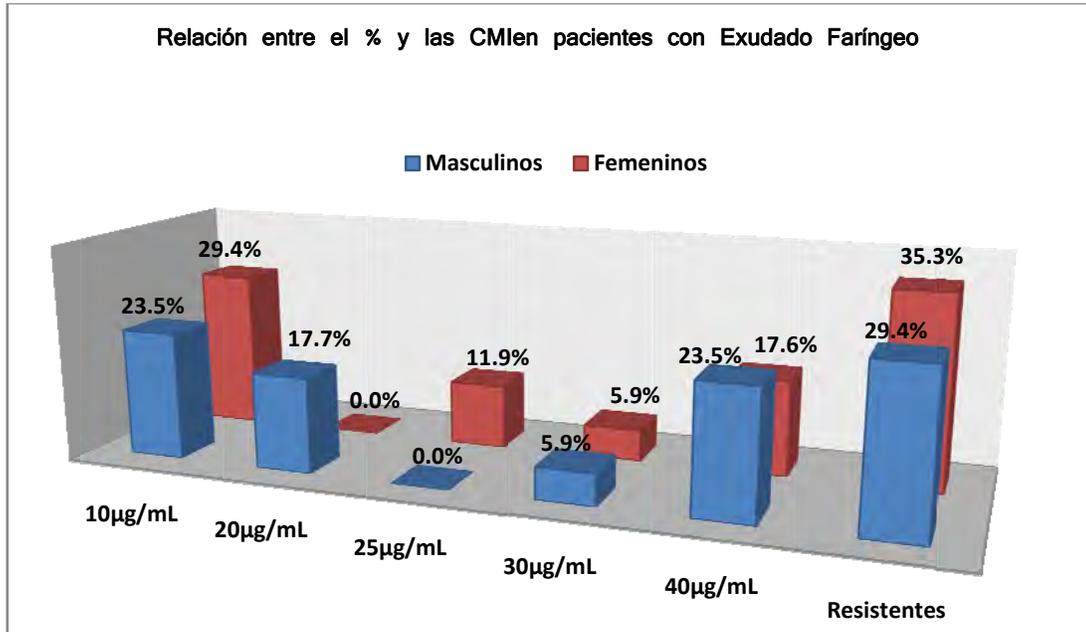


Figura 15.- Comparación del porcentaje de sensibilidad y las CMI en cepas de *C. albicans* a partir de exudado vaginal y urocultivo en pacientes femeninos,

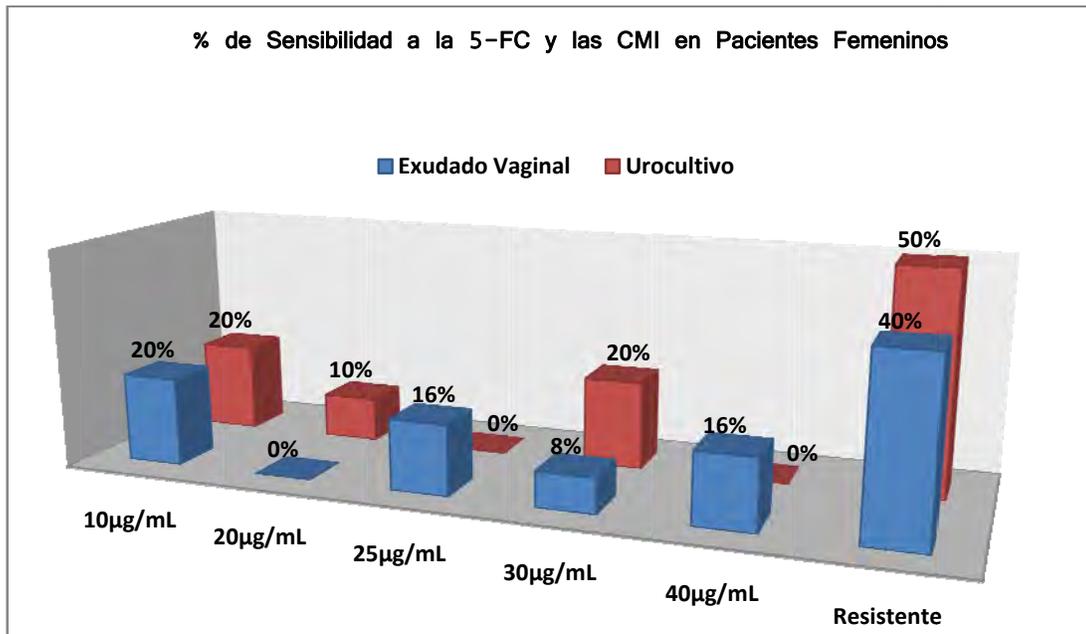


Figura 16.- Relación entre el porcentaje de sensibilidad a la 5- Fluorocitosina y las CMI en Cepas de bovinos con mastitis, la grafica muestra incremento en el porcentaje conforme aumenta la concentración de 5-FC utilizada. El mayor porcentaje corresponde a cepas que presentan resistencia al antimicótico.

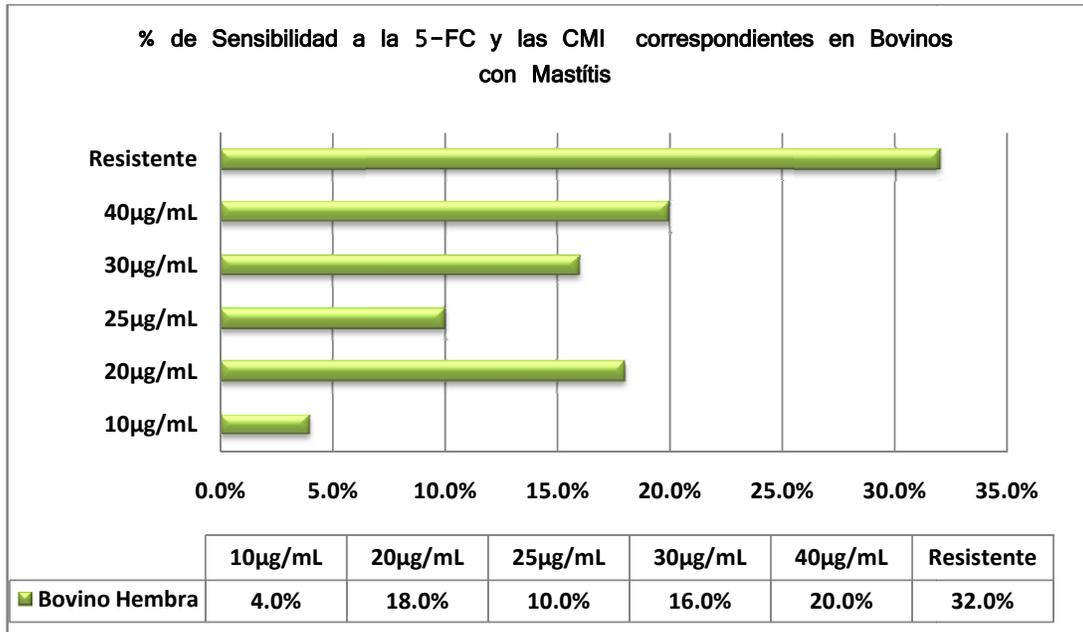


Figura 17.- Número de cepas sensibles a la 5-Fluorocitosina de acuerdo a sus CMI en las tres poblaciones estudiadas. Se observa una tendencia a la resistencia contra la 5-FC en todas las cepas estudiadas, siendo las de origen femenino las que mayor índice representan (21 cepas), seguidas de las de origen bovino (16 cepas) y por último las de origen masculino (11 cepas).

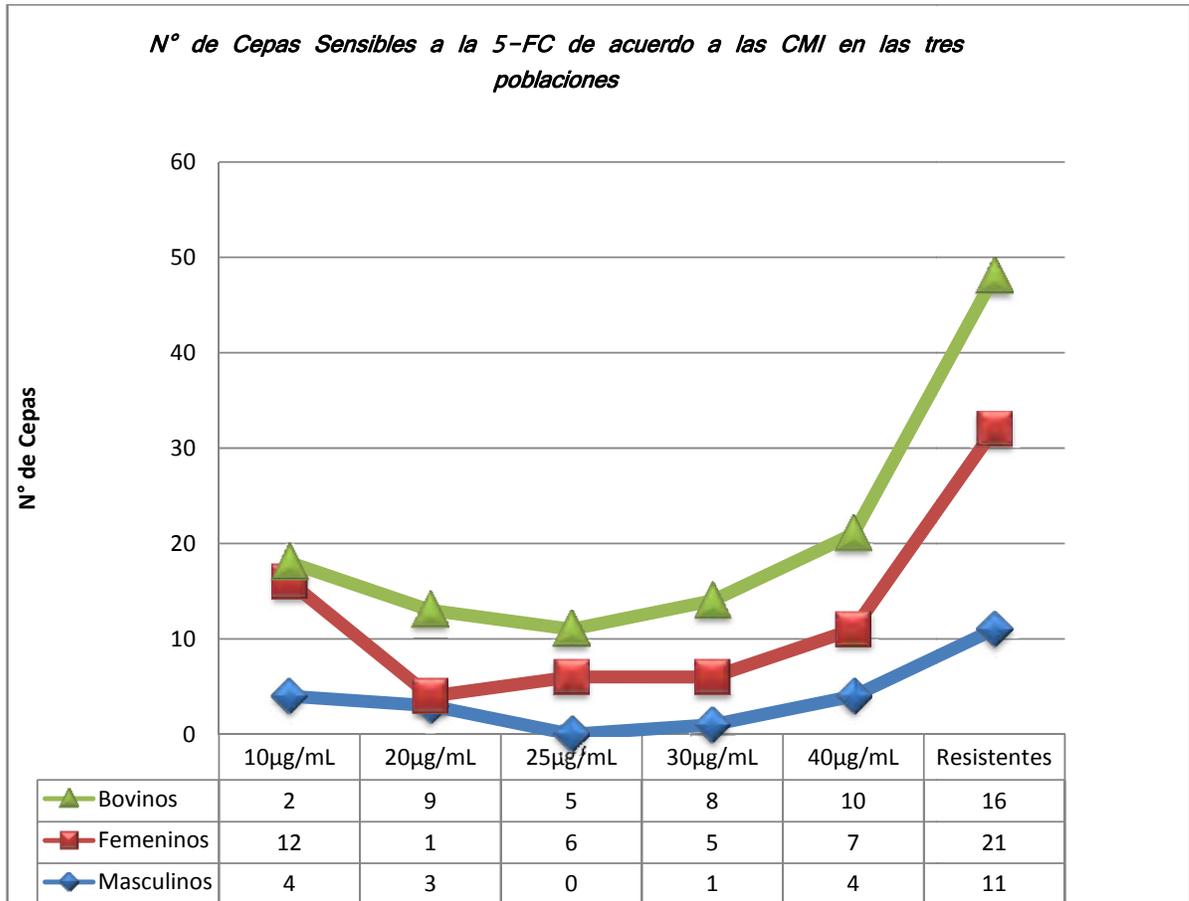
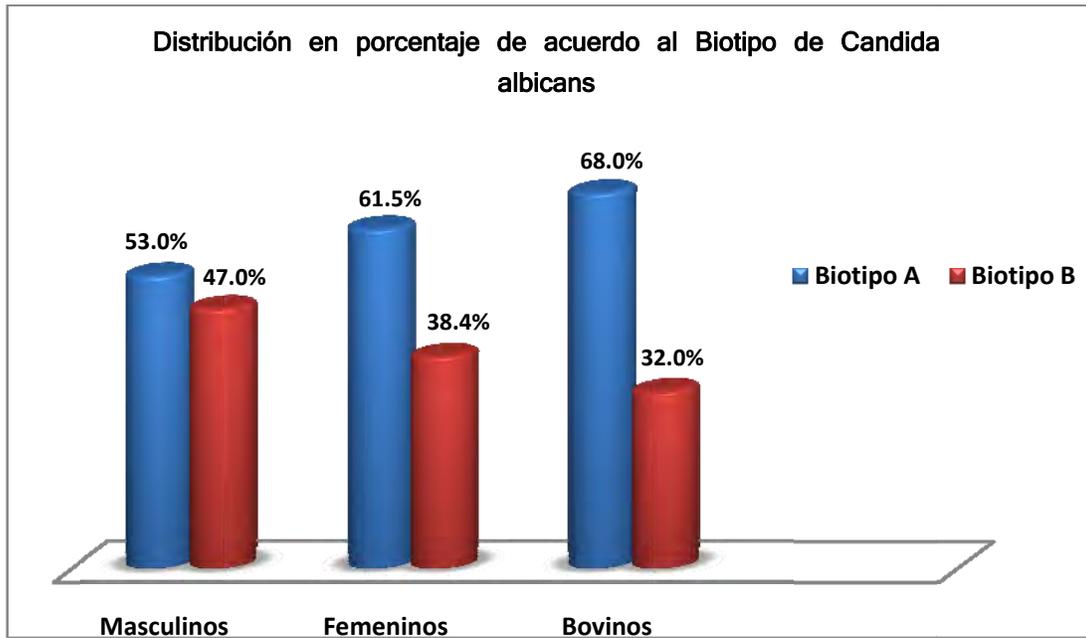


Figura 18.- La grafica muestra los porcentajes de ambos biotipos encontrados para las tres poblaciones estudiadas.



5 DISCUSION

De las Cepas estudiadas el mayor porcentaje corresponde a las cepas de origen Femenino con 41.6%, posteriormente el 40.0% corresponde a las de origen bovino y un 18.4% a las de origen Masculino, así como se demuestra en la figura 12, éstos porcentajes se deben más al tamaño de cada muestra estudiada, otros diversos factores ayudan a la predisposición en la infección por *Candida* en pacientes femeninos tales como cambios hormonales, pH vaginal y tratamientos con antibióticos. [11]

El estudio comparativo entre la sensibilidad y resistencia a la 5-FC en las tres poblaciones demuestra una mayor incidencia de cepas sensibles al antimicótico lo cual implicaría un biotipo A en las cepas de *Candida*. Los datos obtenidos con nuestro estudio observados en la figura 13, difieren de los obtenidos por Schöler y col. [11] en la población de Norteamérica en donde el biotipo predominante es el biotipo B el cuál es resistente a la 5-FC

Otro punto importante a resaltar es la proximidad en el porcentaje de cepas resistentes al de las cepas sensibles, tanto de pacientes masculinos como femeninos, lo cual difiere considerablemente en la población de Bovinos en donde se observa que el porcentaje de resistencia no es tan próximo al de las cepas sensibles, tal vez debido a que los factores predisponentes a la infección, proliferación y resistencia de *Candida* pueden ser diferentes en esta especie. [13]

La disminución en el porcentaje de cepas conforme aumenta la CMI para ambas poblaciones demuestra mayor efectividad del antimicótico para inhibir el crecimiento de la levadura (en concentraciones de 10 hasta 30 ug/mL), según lo demuestra la figura 14, por arriba de esta concentración se observa un mayor grado de resistencia, en nuestra bibliografía de apoyo, Hasenclever y Mitchel en 1961 [19] demostraron que el rango de efectividad para inhibir el crecimiento de la *Candida* correspondía entre 10 a 25 ug/mL del antimicótico, considerando por arriba de ésta como resistentes a las demás cepas.

La alta incidencia de las levaduras de *C. albicans* en ambos tipos de muestras es claro desde el punto de vista en que *Candida* es miembro de la flora normal de la mujer a nivel de la mucosa vaginal, mas sin embargo su proliferación y la resistencia puede verse aumentada posterior al tratamiento con antibióticos o glucocorticoides así como también en el periodo del embarazo y diabetes.

Aún cuando las cepas de exudado vaginal son las que tienen mayor representatividad en todas las concentraciones de 5-Fluorocitosina utilizadas (figura 15), las que presentan mayor resistencia al antimicótico son las correspondientes a las muestras de urocultivo.

La tendencia a la infección por las cepas de *Candida* en Bovinos en la figura 16 puede explicarse desde el punto de vista en que a menudo los animales son individuos malnutridos o se encuentran tras un largo periodo de tratamiento lo que favorece la invasión proliferación y patogenicidad de la levadura [13]

La sensibilidad a la 5-Fluorocitosina observada en las tres poblaciones de la figura 17, representa un parámetro importante como índice discriminatorio sobre el biotipo de *C. albicans* en nuestra población el mayor índice observado en mujeres puede ser una condición común si se asocia a los cambios hormonales a los que se ve afectada en periodos menstruales y de embarazo, así como en el tratamientos con antibióticos de amplio espectro u otros estados en donde el pH vaginal se ve disminuido como en la diabetes mellitus.[12]

El mayor porcentaje de las cepas de *Candida* corresponde al biotipo A el cual se determinó por la respuesta de sensibilidad a la 5-Fluorocitosina presentada en las tres poblaciones estudiadas (figura 18), el biotipo B se muestra en menor porcentaje para las tres poblaciones y se determinó por la resistencia que presentaron las cepas de *Candida* a concentraciones mayores de 40 µg/mL de 5-Fluorocitosina. [2] [11]

6 CONCLUSIONES.

Se llevó a cabo la identificación de 125 cepas de *C. albicans*, el mayor porcentaje obtenido corresponde al biotipo A en las tres poblaciones estudiadas, el cual se determinó por la respuesta de sensibilidad a la 5-Fluorocitosina y el menor porcentaje correspondió al biotipo B con respuesta de resistencia a la inhibición por la 5-Fluorocitosina a concentraciones superiores a 40µg/mL

Los resultados de inhibición en el crecimiento de *C. albicans* en nuestro estudio corroboraron lo realizado por Hasenclever y Mitchel en donde demostraron que el rango de efectividad para inhibir el crecimiento correspondía entre 10 a 25 µg/mL del antimicótico, considerando por arriba de esta concentración, resistentes a todas las demás cepas. [19]

El biotipo predominante en nuestra población humana tanto en hombres como en mujeres, fue el biotipo A, encontramos que estos datos difieren de los encontrados por Drouhet y col., y Schóler y col., en donde el biotipo predominante tanto en Europa como en Norteamérica corresponde el Biotipo B. [42]

Las cepas de origen Bovino en nuestro estudio demostraron gran sensibilidad al antimicótico siendo el biotipo A el predominante en este grupo poblacional.

El cultivo e identificación de las cepas de *Candida*, así como la posterior realización de pruebas de susceptibilidad, deben ser tomados en cuenta para el establecimiento de una terapéutica adecuada, sobre todo cuando se presentan aislamientos de *C. albicans* biotipo B (Resistentes)

Las pruebas de susceptibilidad in vitro utilizadas ofrecen resultados comparables a los reportados por otros autores; por lo tanto, se presume su adecuada estandarización. Además, son de fácil uso y tienen buena relación costo/beneficio y se pueden desarrollar en poco tiempo obteniendo un resultado óptimo para la Identificación del biotipo de *C. albicans*

Es necesario realizar estudios similares con un mayor número de cepas para cada grupo analizado, con el fin de aumentar las posibilidades de obtener diferencias estadísticamente significativas. Aún cuando el tamaño de la muestra estudiada en nuestro análisis no se compara con lo realizado por Auger y Dumas en Canadá (666 cepas en 1979), ni por la evaluación de Drouhet y col. (519 cepas en 1975) [42], los resultados obtenidos son un buen argumento para suponer que el Biotipo predominante en nuestra población mexicana es el A.

Es recomendable obtener mayor información sobre el tratamiento previo de los pacientes y sobre el número de episodios de candidiasis sufridos, con la finalidad de establecer si existe o no relación con la posterior aparición de resistencia de los biotipos de *C. albicans* y poder establecer así una adecuada terapéutica.

Desde los primeros trabajos realizados por Auger y col. en 1979 [1] se conoció que la resistencia a la 5-FC era más frecuente en los aislamientos de cepas del biotipo B. Cuando se conoce que el biotipo predominante en una región determinada es el biotipo A, la 5-FC podría utilizarse en casos con candidiasis sistémica que requieren tratamiento inmediato y que por su estado general o deficiente función renal no soportarían un tratamiento con amfotericina B. Si el biotipo B es el predominante, la 5-FC no debería ser considerada la droga de elección en tanto no se disponga de los resultados de sensibilidad de la cepa en cuestión.

7 REFERENCIAS

- 1.- **AUGER P. DUMAS, C. JOLY J.** 1979. A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosine. Jour. Infect. Dis. 139: 5, 590-594
- 2.- **VELEGRAKYI A.** 1995. In vitro susceptibility to itraconazole and fluconazole of switch phenotypes of *Candida albicans* serotypes A and B, isolated from immunocompromised hosts. Jour. Med. & Vet. Myc. 33: 83-85
- 3.- **BRAWNER DIANE L.** 1991. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. Jour. Clin. Microb. 29: 5, 1020-1025
- 4.- **VANDEN BOSSCHE H. WARNOCK D.W.** y col. 1994. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance . Jour. Med. & Vet. Myc. 32: 189-202
- 5.- **FASOLI M. O.F. KERRIDGE D. RILEY J.F.** 1990. Pathogenicity of 5-fluorocytosine resistant strains of *Candida albicans*. Jour. Med. & Vet Myc. 28: 27-34
- 6.- **PEREZ DIAZ C.G., NOMBELA C.** 1994. Inhibitory and morphological effects of several antifungal agents on three types of *Candida albicans* morphological mutants. Jour. Med. & Vet. Myc. 32. 151-162
- 7.- **WHELAN W. L. BENEKE E. S.** y col. 1981. Segregation of 5-fluorocytosine- resistant variants by *Candida albicans*. Antimic. Agents. & Chem. 19: 6. 1078-1081
- 8.- **RIPPON J.W.** 1988. Micología Médica 3ª Ed. Philadelphia. W.B: Saunders 532-581
- 9.- **ARENAS R.** 1993. Micología Medica Ilustrada. 1ª Ed. Interamericana. 20: 223-233
- 10.- **KONEMAN, ALLEN, DOWELL,** y col. 1992. Diagnóstico Microbiológico. 3ª Ed. Medica Panamericana. 14: 656-717
- 11.- **ODDS F.C.** 1988. *Candida* & Candidosis 2ª. Ed. Bailliere Tindall. 6: 60-67; 8: 93-104; 27: 305 – 308
- 12.- **ELLIS DAVID H.** 1993. Clinical Mycology. Pfizer. 3: 17-41
- 13.- **GILLESPIE J.H. TIMONEY J.F.** 1990. Hagan & Bruner Enferm. Infec. De los Anim. Domest. 3ª Ed. La Prensa Medica mexicana. 33: 355-356, 35: 375-377
- 14.- **SEGUNDO Z.C.** 1991. Manual Teórico Práctico de Micología Medica para la Carrera de QFB. (Prácticas y Alternativas) Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- 15.- **MONTES DE OCA T.R.** 1997. Identificación de la enzima enolasa en Cepas de *C. albicans* aisladas a partir de humanos y bovinos Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- 16.- **CHAPARRO RJ.** 1993. Estandarización de la prueba de aglutinación con partículas de látex para el Dx del antígeno circulante en infecciones por *Candida albicans* Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

- 17.- **SUMMERS DF, GOLLMAN AP, HASENCLEVER HF.** 1964. Polisaccharide antigens of *Candida* Cell Wall. J. Immunol. 92: 491-499.
- 18.- **NISHIKAWA A, SHINODA T, FUKASAWA I.** 1982. Immunochemical Determinant Serological Specificity of *Candida krusei*. Mol. Immunol. 19: 367-373
- 19- **HASENCLEVER HF, MITCHELL WO, LOEWE J.** 1961. Antigenic studies of *Candida*. II Antigenic relation of *Candida albicans* group A and group B to *Candida stellatoidea* and *Candida tropicalis*. J. Bacteriol. 82: 574-577
- 20.- **MEHTA R.J. NASH CH. III. BOZZOLA J. J.** 1982. Virus like particles and lytic plaque formation in lawns of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 152: 502-505
- 21.- **ODDS F.C. ABBOTT A.B.** 1980. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. Sabouraudian 18: 301-318
- 22.-**WARNOCK D.W.MCCREIGHT M.C,** 1982. Enhanced differentiation of isolates of *Candida albicans* using a modified resistogram method. Mykocen. 25:589-598.
- 23.- **STILLER R.L, BENNETT J.E, SCHOLER H.J, M. WALL, A. POLAK, D.A.STEVENS.** 1983. Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. J. Infect. Diseases 147: 1070-1077
- 24.- **STEER PAUL L. M.D., MARKS MELVIN I. M.D., KLITE PAUL D. M.D., EICKHOFF C.** 1972. 5-Fluorocytosine: An oral antifungal compound. Annals internal Medicine 76: 15-22
- 25.- **SCHIFFMAN R.L., JOHNSON S.T., WEINBERGER S.E.,** y col. 1982. *Candida* lung abscess: Successful treatment with Amphotericin B and 5-Flucytosine. Am. Rev. Respir Dis. 125: 766-768
- 26.- **PARDI GERMAN, CARDOZO ELBA INES.** 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontologica Venezuela Vol 40 N° 1: 10-15
- 27.- **VALERIO VIDOTO, CRISTIANE YUMI KOGA ITO, ROSANGELA MILANO, BARBARA FIANCHINO, JOSE PONTON** 1999. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 16: 208-210
- 28.-**DE LA PARTE MARIA ANTONIA, MENDOZA MIREYA, BRITO ANA.** 2006. Identificación de especies de levaduras del género *Candida* provenientes de pacientes con vulvovaginitis. Academia biomédica digital Venezuela Abril - Junio N°27:1-6
- 29.-**SILVA VICTOR, CABRERA MACARENA, DIAZ MA. CRISTINA, ABARCA CLAUDIA, HERMOSILLA GERMAN.** 2003. Prevalencia de biotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol. 20: 46-51
- 30.- **CEBALLOS SALOBREÑA ALEJANDRO, GAITAN CEPEDA LUIS A. ORIHUELA CAÑADA FRANCISCO OLEA BARRIONUEVO DELFINA, CEBALLOS GARCIA LAURA, QUINDOS GUILLERMO.** 1999. Resistencia *in vitro* a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidosis oral. Rev Iberoam Micol; 16: 194-197

- 31.-**CARRILLO MUÑOZ ALFONSO JAVIER, ABARCA LOURDES, QUINDOS GUILLERMO.** 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Rev Iberoam Micol. 18: 150-155
- 32.-**PANIZZIO MA. MERCEDES, PEREZ CARMEN, MANISCALCHI MA. TERESA,** 2000. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida sp.* y biotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y recurrente. BSVM v.20 n.1 Caracas ene. 1- 12
- 33.- **PUERTO J.L., GARCIA MARTOS P., MARQUEZ A. GARCIA AGUDO L., MIRA J.** 2000. Candidiasis orofaríngea Rev Diagn Biol v.50 n.4 Madrid oct.-dic. . 1-10
- 34.- **MARTINEZ M.M., MENDEZA P., DAZA R.M., SANCHEZ G., MARTIN P., MARTIN J.E., PORTERO F.** 1998. Estudio de la sensibilidad in vitro de levaduras por el sistema ATB-Fungus. Revista Española de Quimioterapia Septiembre; Vol. 11, N°.3. 1-3
- 35.-**CAMPOS MARLEN, HERRERA MARCO LUIS, MARIN JOSE PABLO, MOYA TATIANA, VARGAS ALVARO.** 2003. Especies de *Cándida* en el Hospital Nacional de Niños 1995 – 2001. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) v.38 n.1-2 San José. 1-4
- 36.-**PERURENA LANCHA MAYDA ROSA, MARTINEZ MACHIN GERARDO, FERNANDEZ ANDREU CARLOS MANUEL, LEAL TABARES MA. MAGDALENA.** 2001. *Candida albicans* biotipo B en pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana. Rev Cubana Med Trop53(3):222-3
- 37.-**OLIVER MARGARITA, DE GONZALEZ MA. IBELISE, MENDOZA MIREYA, BASTARDO DE ALBORNOZ MA. CECILIA.** 1999. Biotipos de *Candida albicans* aislados en pacientes VIH positivos. Rev Iberoam Micol. 16: 204-207
- 38.- **GARCIA J.F., SCHNEIDER J., PONTON J.** 1994. Vulvovaginitis candidiásica. Med Clin (Barcelona) 103: 505-508
- 39.- **HASENCLEVER HF, MITCHELL WO.** 1961. Antigenic Studies of Candida I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 82: 570-573
- 40.-**HASENCLEVER HF. MITCHELL WO.** 1960. Antigenic relationship of *Torulopsis glabrata* and seven species of the genus *Candida*. J. Bacteriol. 79, 677-681.
- 41.- **REINGOLD AL, LUXD, PLIKAYTIS BD, AJELLO L.** 1986. Systemic mycoses in the United States, 1980-1982. J. Med. Vet. Mycol. 24, 433-436.
- 42.- **DROUHET E, MERCIER-SOUCY, L MONTPLAISIR.** 1975. Sensibilité et résistance des levures pathogènes aux 5-fluoropyrimidines. I. Relation entre les phenotypes de résistance a la 5-Fluorocytosine, le sérotype de *Candida albicans* et l'écologie des différentes especies de *Candida* d'origine humaine. Ann Microbiol. (Paris) 126B 25-39
- 43.- **WARNOCK DW, SPELLER DCE, DAY JK, FARRELL AJ,** 1979. Resistogram method for differentiation of strains of *Candida albicans*. J. Appl. Bacteriol. 46: 571-8
- 44.- **POLAK, A. SCHOLER, H. J.** 1975. Mode of action of 5-Fluorocytosine and mechanisms of resistance. Chemotherapy. 21: 113-130