

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

PRODUCCION DE CANDIDINA
A PARTIR DE UNA CEPA NATIVA DE *Candida albicans*

Informe de Tesis
Presentado por
Ana Cecilia Díaz Ovalle
Para optar el Título de

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, mayo de 1999

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA: LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO: LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I: DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II: DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III: LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV: BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V: BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS: Por regalarme la oportunidad de vivir.
- A MIS PADRES: Franciso Díaz y Dolores de Díaz, por ser mi inspiración.
- A MIS ABUELITOS: Especialmente a Consuelo Rodríguez y a Juan Augusto Ovalle.
- A LAS FAMILIAS: Girón Díaz, Calvillo García, Estrada Magariño y Ovalle Melgar con cariño especial.
- A TODOS MIS AMIGOS: Especialmente a Gabriella, Elizabeth Karla, Karen y Laura por su amistad sincera.
- A MI NOVIO: Pablo Mayorga, con amor y admiración por su paciencia y apoyo incondicional.
- A MIS SOBRINAS: María Fernanda y Rosa Gabriela, con amor especial.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO A TODAS LAS PERSONAS E INSTITUCIONES QUE EN UNA U OTRA FORMA HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO, ESPECIALMENTE AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y AL DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA BASICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO.

INDICE

	No. de página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Generalidades de <i>Candida albicans</i>	5
3.2 Factores de virulencia	6
3.3 Composición química de la pared celular	7
3.4 Antígenos de <i>C. albicans</i>	9
3.5 Aplicaciones de los antígenos de <i>C. albicans</i>	11
4. Justificación	14
5. Objetivos	15
6. Hipótesis	16
7. Materiales y Métodos	17
8. Resultados	24
9. Discusión de Resultados	26
10. Conclusiones	29
11. Recomendaciones	30
12. Referencias	31
13. Anexos	39

1. RESUMEN

Candida albicans es un hongo levaduriforme que forma parte de la microbiota de las superficies cutáneas, mucosa bucal, intestino, ano y mucosa vaginal. Es un hongo de crecimiento rápido (24 a 48 h) que crece perfectamente a 27 °C y a 37 °C, tanto en medios micológicos, como en medios bacteriológicos.

C. albicans tiene factores de virulencia responsables de causar infección en personas inmunodeprimidas, como un resultado en la falla de la respuesta celular. Algunos de los factores de virulencia son: toxinas, enzimas, adhesinas y receptores del complemento.

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente de manana, glucana y quitina. Se han encontrado antígenos como parte de componentes de la pared celular, membrana celular y citoplasma y como productos secretados, conocidos también como metabólicos, por ser parte de las secreciones de la actividad metabólica. Los antígenos citoplásmicos y de la pared celular se pueden obtener por destrucción del microorganismo con un sonicador y separados por centrifugación. Los antígenos metabólicos se obtienen a partir del filtrado de los medios de cultivos.

Con los antígenos metabólicos se puede medir la respuesta inmune en personas, mediante la prueba de intradermorreacción (IDR). Esta resulta ser una de las pruebas más sensibles para determinar la inmunidad tardía mediada por células. Es importante elaborar antígenos a partir del hongo aislado de la región donde se va a utilizar, ya que así la especificidad de la respuesta inmune aumenta. En el

presente trabajo se preparó candidina a partir de antígeno metabólico concentrado, usando cuatro cepas nativas de *C. albicans*, Nos. 747, 752, 821 y 895, aisladas de casos humanos. A las cepas se les determinó curva de crecimiento y cada fase log está comprendida entre las 18-20 h. Separadamente se cultivaron en Czapeck modificado a 26 °C y se inactivaron con timerosal cumplida la fase log. A las 24 h se filtraron y concentraron. Utilizando inmunodifusión simple en gel de agarosa al 1% contra antisuero de *C. albicans*, se determinó que la cepa más reactiva fué la No. 895 por presentar más bandas de precipitación. A partir de la ella se ajustó la candidina para IDR. A la candidina se le realizaron pruebas de esterilidad y resultó estéril. La reactividad intradérmica de la candidina se determinó inyectándola en 10 personas, de las cuales, por lo menos 8 debían dar positiva la prueba. El criterio que se utilizó para una prueba positiva a la candidina fué la formación de un diámetro ≥ 5 mm de induración. Se encontró que las 10 personas inyectadas dieron positiva la prueba de IDR. Con ello queda demostrado que en este estudio se produjo un buen antígeno metabólico a partir de la cepa No. 895 de *C. albicans*, ya que cumple con las siguientes condiciones: presenta el mayor número de bandas en inmunodifusión y es reactivo intradérmicamente.

2. INTRODUCCION

Desde hace más de 10 años se han llevado a cabo estudios en México utilizando la candidina elaborada en dicho país. Los investigadores mexicanos la han aplicado, tanto en el campo del estudio de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes con enfermedades respiratorias, como en el criterio para el diagnóstico de candidosis sistémica y llegaron a la conclusión que los resultados son mejores al usar candidina obtenida a partir de una cepa mexicana, es decir con una cepa nativa. En Estados Unidos y Perú la han aplicado para evaluar el estado nutricional en diferentes poblaciones.

En el presente estudio se trabajó con cuatro de las cepas de *C. albicans* aisladas de casos humanos: Nos. 747, 752, 821 y 895. Con cada una se preparó antígeno metabólico concentrado, a los que se les determinó su concentración de proteínas totales. A partir de la cepa más reactiva (No. 895), se preparó candidina, en la que el antígeno concentrado se diluyó a una concentración de 10 ug de proteínas totales/0.1 ml de solución salina isotónica estéril para ser utilizado en la prueba de IDR. A la candidina preparada se le realizaron pruebas de esterilidad, de empaque y sellado. Es una prueba que debe estar libre de contaminación, ya que es utilizada en pacientes inmunosuprimidos. Esto hace que la elaboración de antígenos requiera paciencia, cuidado y experiencia para evitar contaminaciones.

A pesar del desarrollo de una multitud de procedimientos complejos para la evaluación de la inmunidad celular, la prueba intradérmica es relativamente simple y permanece como una herramienta muy útil y, en ocasiones, sirve para establecer el diagnóstico. La prueba de IDR detecta hipersensibilidad cutánea a un antígeno o grupo de antígenos. Sin embargo, cuando se hacen pruebas para una enfermedad infecciosa, una respuesta positiva no indica una infección activa con el agente que se está probando. Las pruebas de hipersensibilidad cutánea tardía también son de gran valor en la evaluación general de la inmunocompetencia en estudios epidemiológicos. La incapacidad para reaccionar contra una batería, de antígenos cutáneos habituales se denomina anergia. La candidina forma parte de la batería de dichos antígenos.

La principal razón por la que se utiliza candidina como parte de la batería para evaluar anergia es porque el humano sano tiene elevada inmunidad natural a la infección por *Candida*, por ello las personas sanas reaccionan a la prueba cutánea con antígenos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de *C. albicans*

C. albicans pertenece a los subfilos Basidiomycotina y Ascomycotina de los Dikariomycota y se encuentra dentro del género *Blastomyces* del subfilo Deuteromycota (anamorfos de los Dikaryomycota), los cuales fueron conocidos en la antigua literatura como hongos imperfectos (1).

Es un hongo levaduriforme que es parte de la microbiota de las superficies cutáneas, mucosa bucal, intestino, ano y mucosa vaginal (1). Presenta levaduras ovaladas o globosas, gemantes con tamaños distintos, además puede presentar pseudomicelio y/o micelio verdadero, tanto en muestras clínicas como en los diferentes medios de laboratorio (2). Generalmente se reproduce por gemación, pero también puede hacerlo por fisión binaria (3).

Es un hongo de crecimiento rápido (24 a 48 h) que crece perfectamente a 27°C y a 37°C, tanto en medios micológicos (Sabouraud y Sabouraud con antibióticos) como en medios bacteriológicos no específicos (agar sangre, chocolate o agar nutritivo). Su colonia es de color crema, pastosa y lisa semejante a una “gota de parafina”, que con el tiempo se va tornando rugosa y plegada. En algunas cepas, dentro del medio de cultivo se puede observar la

presencia de raicillas que salen del reverso de la colonia, lo cual es bastante característico de *C. albicans* (2).

La morfología macro y microscópica de la colonia no es concluyente para su identificación, por lo que es necesario utilizar pruebas adicionales como la producción de tubos germinales, formación de clamidosporas y la asimilación de carbohidratos por la técnica del auxonograma de carbono. Para la identificación de levaduras también puede utilizarse un sistema bioquímico automatizado, por ejemplo: API y Quantum de Abbott (2).

3.2 Factores de virulencia

Toxinas: se han hecho esfuerzos para identificar toxinas de *Candida* análogas a las exotoxinas y endotoxinas bacterianas, pero se ha encontrado que no tienen propiedades biológicas equivalentes a ellas. Existen extractos de glicoproteínas de la pared celular de *Candida* que son letales y pirogénicas e inducen shock anafiláctico en varios modelos animales.

Enzimas: han sido descritas las actividades de 40 enzimas hidrolíticas, como por ejemplo: fosfatasa ácida, fosfolipasa, proteinasa, aminopeptidasa, estearasa y treolasa. La fosfatasa ácida ha sido asociada con la patogenicidad del microorganismo y la actividad de la fosfolipasa se ha correlacionado con mortalidad en ratones y adherencia de las células fúngicas a su epitelio bucal.

Adhesinas: la habilidad de diferentes especies de *Candida* a adherirse en las células del hospedero son correlativas con su virulencia. Recientes estudios sugieren que la fibronectina y laminina pueden mediar el enlace del patógeno a las células humanas y membranas basales.

Receptores del complemento: pueden tener influencia en la virulencia, derivada de la opsonificación. Receptores para C3d y CR2, CR3 y iC3b fueron encontradas en la superficie molecular de leucocitos fagocíticos que median la opsonificación del microorganismo, excepto en *C. stellatoidea*, las otras especies de *Candida* tienen habilidad para hacer bandas con fragmentos del complemento, que median adhesión al patógeno. La fracción iC3b puede mediar la adhesión del patógeno a las células de mamíferos, estos receptores han sido recientemente identificados como miembros de los receptores de anticuerpos que reconocen leucocitos humanos (4).

3.3 Composición química de la pared celular

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente de los siguientes polisacáridos: mananas, glucana y quitina (5). Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular es dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y estados metabólicos, la composición química de la pared celular reportada es: mananas 15.2-22.9 % del peso seco de la pared celular o cerca del 40% del total de los polisacáridos de la pared celular (6), β -1,3-D-glucanas y β -1,6-D-glucanas 47-60% del peso de la pared celular

(7, 8). El contenido de proteínas ha sido informado del 6-25% (9, 10, 11, 12, 13, 14), lípidos del 1-7% y quitina de 0.6-9% del peso de la pared celular (15, 16, 17, 18) (Anexo 1).

La capa fibrilar externa de la pared celular tanto de células levaduriformes y filamentosas está compuesta de mananas y también se depositan en otros sitios dentro de la pared celular. La cantidad de mananas producida por la células depende del medio de crecimiento y de la edad de la célula (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). La fracción de mananas de *C. albicans* comprende del 20 al 30% del peso de la pared celular (8) y es el principal componente antigénico de las células levaduriformes intactas. Análisis de mananas realizados indican la existencia de dos serotipos diferentes, el A y el B. Análisis químicos han mostrado que las mananas de *C. albicans* son similares a las de *Saccharomyces cerevisiae* (26). Las mananas contienen un polisacárido altamente ramificado compuesto principalmente de unidades de manosa unidas entre sí y a través de un dímero de N-acetilglucosamina, el cual está unido a un residuo de asparagina. Alternativamente, la manosa puede unirse a la proteína a través de residuos de serina o treonina. Las unidades de manosa están unidas por enlaces en posición alfa-1,6, formando un esqueleto al cual se enlazan cadenas laterales de manosa que se unen por enlaces en posición alfa-1,2 y alfa-1,3 (27). Estas cadenas laterales son los principales determinantes antigénicos y parece ser que las manoproteínas del serotipo A contienen cadenas más largas que las del serotipo B (28).

3.4 Antígenos de *C. albicans*

Se han encontrado antígenos como parte de componentes de la pared celular, membrana celular y citoplasma y como productos secretados, conocidos también como metabólicos, por ser parte de las excreciones de la actividad metabólica de *C. albicans* (18).

Los antígenos citoplásmicos han sido usados extensivamente para detectar respuestas humorales de enfermedad invasiva. Desafortunadamente, algunas preparaciones citoplásmicas se contaminan con mananas, lo cual ha resultado que en diferentes estudios se obtienen datos ambiguos (19).

Los antígenos citoplásmicos y de la pared celular se obtienen por destrucción del microorganismo con un sonicador y luego son separados por centrifugación (26).

La existencia de antígenos manoproteicos específicos de la forma de levadura o de micelio ha sido estudiada por diversos autores desde hace varios años. Los primeros antígenos presentes en los extractos celulares fueron demostrados por inmunolectroforesis cruzada usando suero hiperinmune de conejos inoculados con extractos citoplásmicos, posteriormente se encontraron más de 78 antígenos precipitantes en extractos citoplásmicos asociados con blastoconidios. También por inmunolectroforesis se demostraron un limitado número de antígenos presentes en los extractos citoplásmicos de la forma micelial, que no aparecen en la forma de levadura, así como la inmunodominancia de un antígeno de 47 kDa en pacientes con candidosis, éste antígeno se encuentra en ambas fases del hongo (levadura y micelio), el 74% de los

pacientes con candidosis estudiados produjeron anticuerpos contra este componente y se identificaron 4 antígenos compuestos de mananas de alto peso molecular (HMWM), específicos de levadura, con pesos moleculares de 650, 500, 340 y 200 kDa; y 2 mananas específicas de la forma micelial, de 260 y 180 kDa. También se obtuvo un anticuerpo monoclonal contra la manana de 260 kDa, fracción que parece ser un antígeno específico de la forma micelial de *Candida* y que puede facilitar el diagnóstico de la candidosis. A partir de tubos germinativos se aislaron, digeridos con zimolasa, dos antígenos de la pared celular de *C. albicans* de 43 y 47 kDa. El primero reacciona fuertemente con concanavalina A y el otro da una menor reactividad (29, 30, 31, 32, 33, 34).

Recientemente, se ha utilizado la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para analizar los extractos citoplásmicos (27).

Sin embargo la composición química de los antígenos utilizados para diagnóstico aún no está bien definida y sus concentraciones en las pruebas inmunológicas muestran gran variabilidad (35). Esto es por la gran diversidad de metodologías para la obtención de los antígenos que dificulta la comparación de resultados y la estandarización de las técnicas de diagnóstico de la candidosis, sobre todo su forma invasiva.

Como consecuencia de las investigaciones realizadas sobre antígenos de *C. albicans*, se ha podido observar la gran variabilidad antigénica que existe entre cepas del hongo que se encuentran causando enfermedad, de aquellas en que solo actúa como comensal e incluso entre las aisladas de diferentes regiones del mundo. También se demostró la diferencia en reactividad inmunológica de cepas

mantenidas por largo tiempo en el laboratorio. Se ha utilizado la clonación para obtener reproducibilidad en los antígenos (36).

En general, los antígenos secretados ó metabólicos, han sido los menos estudiados y se han usado menos que los citoplásmicos y los de la pared celular. Los antígenos secretados ó metabólicos se usan frecuentemente en ensayos serológicos. A partir de estudios con PAGE se ha determinado la actividad de las enzimas excretadas y que la proteinasa probablemente juega un potencial rol como el principal factor de virulencia (27). Estos antígenos se obtienen a partir del filtrado de los medios de cultivos utilizados como enriquecedores. Los antígenos metabólicos y citoplásmicos tienen mayor especificidad que los de la pared celular(1).

Con antígenos metabólicos de *C. albicans* se puede medir la inmunidad en pacientes, mediante la prueba de IDR, que resulta ser una de las pruebas más sensibles para medir la inmunidad tardía mediada por células (37, 38).

Se ha demostrado que elaborarlo a partir de cepas nativas aumenta la especificidad, haciendo necesario elaborar antígenos a partir del hongo aislado de la región donde se van a utilizar y caracterizar su reactividad biológica (39, 40).

Un buen antígeno metabólico de *C. albicans* es aquel que cumple con dos de las siguientes condiciones: 1) una concentración alta de proteínas totales; 2) mayor número de bandas al enfrentarlo contra el suero hiperinmune (utilizando inmunodifusión radial simple); y 3) ser reactivo intradérmicamente (39, 40).

3.5 Aplicaciones de los antígenos de *C. albicans*

El principal uso que se les da a estos antígenos es la de aplicarlos intradérmicamente para evaluar la respuesta de hipersensibilidad tardía, la cual tiene como base la habilidad de los linfocitos T para reconocer antígenos (41). Si la reactividad inmune se encuentra disminuída se dice que las personas presentan hipoergia, y si está ausente, anergia. Esta se debe a la ausencia de ergininas (productos de la interacción de antígeno y anticuerpo), así como de mediadores de la inflamación (41, 42).

La evaluación de anergia se hace aplicando un panel de al menos tres antígenos aislados de diferentes microorganismos: *Proteus mirabilis*, *C. albicans*, *Clostridium tetani*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Trichophyton* sp. y del virus de paperas (38-53).

Se han llevado a cabo múltiples estudios en los cuales se ha aplicado candidina como parte del panel de antígenos para evaluar: la anergia en pacientes de cirugía (41); los factores epidemiológicos que afectan la respuesta inmune (42); la respuesta para que el hospedero desarrolle resistencia bacteriana (43); la predicción de los factores epidemiológicos que afectan y desencadenan la incidencia de diarrea en niños peruanos (44); en pacientes con cáncer (45); la inmunidad mediada por células en niños de edad escolar (46) y en niños de edad preescolar (38); la respuesta de hipersensibilidad tardía como un indicador del estado de nutrición (38) y; en la evaluación de anergia en

pacientes seropositivos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (52, 54-65).

La prueba para evaluar anergia se hace aplicando, intradérmicamente, 0.1 ml de cada uno de los antígenos, en la cara anterior del brazo. Los antígenos deben ser elegidos dependiendo del área endémica de cada uno de los microorganismos. A las 24 y 48 h, se mide el diámetro de la induración, la cual puede ser medida en mm. Una prueba positiva se define como un diámetro > 5 mm para pacientes VIH-seropositivo y como > 10 mm en otras personas (41-53, 57).

La induración observada en la piel de los pacientes se debe a una serie de eventos que se desencadenan cuando: A) el antígeno es depositado intradérmicamente; B) el antígeno se combina con linfocitos sensibilizados y resulta en la liberación de linfocinas; C) ocurre migración de macrófagos y linfocitos no sensibilizados debido a la atracción quimiotáctica y, D) se da la máxima respuesta con la iniciación de la fagocitosis del antígeno (41) (Anexo 2).

Deben evitarse errores técnicos en la aplicación cutánea, tales como: concentraciones inadecuadas de antígeno, contaminación bacteriana, exposición al calor o a la luz, inyección inadecuada y lectura inadecuada (66).

4. JUSTIFICACION

En la actualidad, los hospitales nacionales no tienen la batería de antígenos que se utilizan para evaluar la respuesta celular tardía. Sólo cuentan con tuberculina, lo cual constituye un problema, ya que la cifra de pacientes con condiciones clínicas relacionadas con anergia son altas.

En el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se cuenta con experiencia en la producción de antígenos fúngicos, por lo que en este trabajo se produjo candidina, a partir de una cepa nativa de *C. albicans*, aislada de un caso humano.

La candidina puede ponerse a disposición de otras instituciones de salud, para la elaboración de diversos ensayos serológicos: inmunodifusión, fijación del complemento, precipitación y la valoración de enzima-ligada inmunoabsorbente (ELISA). Estos pueden ser aplicados para la investigación de diversas condiciones médicas asociadas con anergia: deficiencias inmunitarias, terapia prolongada con adrenocorticoesteroides, quimioterapia, enfermedades hematológicas y reticuloendoteliales (leucemia, linfoma o Hodgkin), fase final de disfunción renal, desnutrición, extremos de edad, estrés mental o fisiológico, algunas enfermedades virales (paperas o viruela), algunas enfermedades bacterianas (fiebre tifoidea, pertussis, brucellosis o lepra) y la sarcoidosis. Lo que facilitará el diagnóstico y monitoreo de las anteriores condiciones clínicas.

5. OBJETIVOS

4.1 Elaborar antígenos metabólicos concentrados a partir de cuatro cepas nativas diferentes de *C. albicans* (Nos. 747, 752, 821 y 895).

4.2 Obtener candidina a partir de la cepa nativa de *C. albicans* más reactiva.

4.3 Determinar la reactividad intradérmica de la candidina, producida y ajustada a una concentración de 10 ug de proteínas/0.1 ml de solución salina, en 10 personas.

6. HIPOTESIS

Intradérmicamente la candidina guatemalteca es reactiva.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Cepas de *C. albicans*

7.2 Muestra

4 cepas nativas de *C. albicans* (Nos. 747, 752 821 y 895) obtenidas a partir de casos clínicos de pacientes que asisten al Servicio de Micología de la Policlínica del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) de la zona 1.

7.3 Recursos

7.3.1 Humanos

7.3.1.1 Investigadora

Br. Ana Cecilia Díaz Ovalle

7.3.1.2 Asesora

Licda. María Luisa García de López

7.3.2 Institucionales

7.3.2.1 Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Departamento de Microbiología.

Servicio de Micología.

Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR).

7.3.3 Físicos

7.3.3.1 Equipo

Autoclave

Incubadora a 27 °C con agitación

Microscopio de luz

Campana de flujo laminar

Espectrofotómetro

Refrigerador

Ultraconcentrador UHP

7.3.3.2 Instrumentos

Cámara de Neubauer

Contadores

Filtros de membrana

Membranas de acetato de celulosa para dializar

Membranas UHP-PM 10,000

Pipetas automáticas

Algodón

Jeringas de 10 ml

7.3.3.3 Cristalería

Pipetas Pasteur

Tubos para cultivo

Matraces

Beakers

Viales

7.3.3.4 Reactivos

Suero hiperinmune anti-*C. albicans* producido en conejos en el laboratorio de Micología Básica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México

API para confirmar levaduras

Medio de cultivo Sabouraud con antibióticos

Medio de cultivo Czapek modificado

Caldo Sabouraud

Caldo Tioglicolato

Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI)

Solución salina isotónica estéril (SSIE)

Etol al 70%

Agua desmineralizada

7.3.3.5 Microorganismos

C. albicans aisladas de las cepas Nos. 747, 752, 821 y 895, proporcionadas por el Servicio de Micología de la policlínica del IGGS de la zona 1.

7.4 Metodología y diseño

7.4.1 Confirmación de cepas de *C. albicans*

Se solicitaron 3 a 4 cepas de *C. albicans*, a la clínica de Micología de la Policlínica del IGSS de la zona 1.

Estas cepas fueron recientemente aisladas de casos humanos (Anexo 3).

Posteriormente se confirmaron utilizando API para levaduras (Anexo 3).

7.4.2 Selección y aislamiento de colonias individuales

En base a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se seleccionaron varias cepas, y se purificaron en medio Sabouraud con antibióticos, para obtener colonias individuales.

7.4.3 Determinación de curva de crecimiento de las cepas

Cada una de las cepas se inoculó en diferentes matraces con Czapek modificado (tiempo 0), y se incubaron a 27 °C con agitación. Se tomaron muestras cada hora, hasta completar las 24. Se graficaron, tiempo *vrs.* consumo de glucosa (67) y se determinó el momento en que finalizó la fase log de cada una de las cepas (Anexo 4).

7.4.4 Preparación de precultivos

Se tomaron 2 a 3 colonias de las diferentes cepas purificadas y se inocularon en matraces diferentes que contenían 100-200 ml de medio Czapek modificado. Se dejaron por 24 h a 27 °C con agitación.

7.4.5 Preparación de cultivos

Se separaron todas las células que se obtuvieron en los precultivos y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min. Después se lavaron 3 veces con solución salina isotónica estéril. Se contaron las células en cámara de Neubauer y se inocularon, en nuevos matraces que contenían Czapek modificado, con 1×10^8 células/ml por cada 100 ml del medio. Se incubaron a 27 °C con agitación. Cada uno de los cultivos se inactivó con timerosal 1:500 (1 parte por cada 10 del volumen del medio de Czapek modificado) al finalizar la fase log correspondiente a cada cepa. Por último los cultivos inactivados se dejaron a temperatura ambiente por 24 h.

7.4.6 Preparación de los antígenos concentrados

Se separaron las células del medio de cultivo por filtración a través de un sistema Millipore, utilizando membranas de filtración con poros de 8, 1.2, 0.8, 0.45 y 0.22 μm de diámetro. Después se concentraron a una décima parte de su volumen utilizando un equipo de ultrafiltración UHP, con una membrana de PM 10,000. A cada muestra con antígeno concentrado se le determinó proteínas totales (68). Estos antígenos fueron guardados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.4.7 Identificación del antígeno concentrado con mayor reactividad

El criterio que se utilizó para determinarlo fué la evaluación de todos los antígenos concentrados contra suero hiperinmune anti-*C albicans* utilizando inmunodifusión simple en gel de agarosa al 1%. El más reactivo fué el que formó más bandas de precipitinas (40). A partir de éste se ajustó la concentración final del reactivo para IDR.

7.4.8 Preparación del antígeno para IDR

7.4.8.1 Dilución del antígeno concentrado

El antígeno concentrado más reactivo se diluyó con SSIE, a una concentración final de 10 μg de proteínas totales/0.1ml de SSIE, para ser usado intradérmicamente. Los volúmenes utilizados se calcularon tomando en cuenta la concentración de proteínas totales del antígeno

concentrado y el volumen total final del reactivo para IDR que se preparó. Se envasaron 10 viales nuevos con 5 ml del reactivo para IDR. No se aplicó ningún preservante para evitar reacciones adversas. Estos viales se mantuvieron en refrigeración (4-8 °C) hasta su uso.

7.4.8.2 Pruebas de empaque/sellado

Para esto se colocaron los viales perfectamente desinfectados en un cultivo de 24 h de *Bacillus subtilis*. A las 24 h se sacaron, se desinfectaron completamente y todo su contenido se virió en cajas de petrí con agar nutritivo. Su interpretación fué: no crecimiento de *B. subtilis* es una prueba negativa; si se observa crecimiento de *B. subtilis* es prueba positiva (69).

7.4.8.3 Pruebas de esterilidad

Por cada 10 viales se tomó 1 al azar y cada uno se inoculó en caldo Sabouraud (26°C), tioglicolato y BHI (36°C). Interpretación: si no se observa algún crecimiento, prueba negativa; si se observa algún crecimiento, prueba positiva(69).

7.4.8.4 Determinación de la reactividad intradérmica

El antígeno de candidina para la prueba intradérmica fué regularizado en 10 reactores conocidos (candidina positivos) a una concentración de 10 ug de proteínas totales/0.1 ml de SSIE. La prueba

se realizó aplicando intradérmicamente 0.1 ml del antígeno en la cara interna del antebrazo. Se leyó a las 24 y 48 h. Se tomó como prueba positiva un diámetro ≥ 5 mm de induración (39, 40).

7.5 Análisis de datos

De las 10 personas inyectadas intradérmicamente, como mínimo, 8 serían reactivas.

8. RESULTADOS

Se estableció que la fase log de las cepas nativas de *C. albicans* Nos. 747, 752, 821 y 895 está comprendida entre las 18 y 20 h (Anexo 4).

Se produjeron de 4-5 ml de antígeno metabólico de cada cepa (Anexo 5). Se determinó la concentración de proteínas de los cuatro antígenos metabólicos concentrados (Anexo 5).

El antígeno metabólico concentrado más reactivo fué el preparado a partir de la cepa No. 895. A partir de éste se preparó el reactivo para IDR. Los volúmenes que se utilizaron fueron: 0.14 ml del antígeno concentrado y 49.86 ml de SSIE para obtener un volumen final de 50 ml del reactivo.

Las pruebas de empaque/sellado y de esterilidad fueron negativas.

Las 10 personas inyectadas presentaron reactividad intradérmica con diámetros mayores de los 5 mm de induración a las 24 y 48 h después de la inyección (Anexo 6).

Los antígenos concentrados son estables a -40 °C. El antígeno para IDR es estable a 4-8 °C.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Las curvas de concentración de glucosa de cada una de las cepas nativas de *C. albicans* (Nos. 747, 752, 821 y 895), no variaron mucho entre sí, ya que las muestras fueron tomadas el mismo día, congeladas inmediatamente hasta el día de su proceso y todas las determinaciones de glucosa hechas con el mismo método colorimétrico. La fase log de cada una de las cepas está entre las 18 y 20 h, lo cual concuerda con lo informado por investigaciones previas (39, 40).

Se obtuvo antígenos metabólicos estériles, ya que la prueba de esterilidad fue negativa, es decir, que no se observó crecimiento de ningún microorganismo en los medios respectivos. Esto resultó de manejar todo con asepsia: se trabajó en la campana de flujo laminar del Depto. de Micología (perfectamente desinfectada) y con cuidado de no contaminar el medio Czapeck modificado. La filtración de cada uno de los cultivos requiere mucha manipulación. Sin embargo ninguno se contaminó.

La pérdida de volúmenes finales de antígenos concentrados se debió al momento de trasvasar de un recipiente a otro, pero no es significativo, ya que lo obtenido, es suficiente para trabajar numerosas pruebas para IDR.

En la determinación de las proteínas de los antígenos concentrados, los resultados fueron diferentes para el antígeno de la

cepa No. 752 (Anexo 5), porque fue concentrado con una membrana Sartorius-PM 10,000 de acetato de celulosa, y los otros con una UHP-PM 10,000 de polisulfonas. El cambio de membrana ayudó a que la concentración de los otros 3 antígenos fuera mejor. Esto se comprobó con la inmunidifusión simple, ya que la cepa No. 752 presentó poca reactividad contra el suero hiperinmune anti-*C. albicans*.

La cepa No. 895 fue la más reactiva, ya que presentó el mayor número de bandas de precipitinas. Sin embargo podría utilizarse el criterio de la concentración más alta de proteínas totales para preparar candidina para IDR y regularizarla en reactores conocidos (39, 40).

Se comprobó que la candidina producida en éste trabajo es adecuada para ser usada en pruebas de IDR. Se logró trabajando la dilución del antígeno concentrado con volúmenes exactos (para obtener concentraciones exactas) y de inyectarla adecuadamente. Para éste procedimiento se debe asegurar que el 0.1 ml se inyecte completamente debajo de la piel (se observa la formación de una bombita en la piel, provocada por el volumen que se introdujo). Si el líquido no llega el tejido "blanco" se pueden obtener falsos negativos.

Las 10 personas inyectadas con la candidina reaccionaron positivamente a la candidina. Esto significa que tienen una adecuada respuesta primaria de linfocitos sensibilizados, con desencadenamiento de todos los sucesos posteriores (Anexo 2).

Los antígenos concentrados permanecieron guardados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 año antes de preparar el antígeno para IDR, por lo que se pudo determinar que son estables a esa temperatura. El reactivo para IDR fué refrigerado ($4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 2 meses hasta su aplicación, por lo que se pudo establecer que es estable a esa temperatura.

10. CONCLUSIONES

10.1 La fase log de cada una de las cuatro cepas nativas de *C. albicans*, Nos. 747, 752, 821 y 895, se encuentra entre las 18 y 20 h.

10.2 Exitosamente se elaboraron volúmenes finales de 4 a 5 ml de antígenos metabólicos concentrados a partir de las cuatro cepas nativas de *C. albicans*.

10.3 Los antígenos metabólicos de *C. albicans* se concentran bien utilizando una membrana UHP-PM 10,000 de polisulfonas.

10.4 Una concentración alta de proteínas totales o crudas no significa que el antígeno sea el más reactivo.

10.5 El antígeno concentrado más reactivo es el preparado a partir de la cepa No. 895.

10.6 La candidina que se preparó es reactiva intradérmicamente.

10.7 En este estudio se produjo un buen antígeno metabólico a partir de la cepa No. 895 de *C. albicans*, ya que cumple con las siguientes condiciones: presenta el mayor número de bandas en inmunodifusión y es reactivo intradérmicamente.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Utilizar la candidina para hacer estudios en condiciones clínicas asociadas con anergia: deficiencias inmunitarias, terapia prolongada con adrenocorticoesteroides, quimioterapia, desnutrición, extremos de edad, estrés mental o fisiológico, algunas enfermedades virales (paperas o viruela) y algunas enfermedades bacterianas (fiebre tifoidea, pertussis, brucelosis o lepra) y la sarcoidosis .

11.2 Estandarizar candidina con las cepas Nos. 747, 752 y 821 y probar su reactividad para que también puedan ser utilizadas en estudios con poblaciones que tengan condiciones clínicas asociadas a anergia y con ello, poner todas las candidinas a disposición de los hospitales.

12. REFERENCIAS

1. Rippon JW. Micología Médica. Castañeda L, trad. 3 ed. México: Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., 1990. 855p.
2. Logemann HE. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer, 1998. 227p.
3. Pelczar MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiología. Capella A, Tay J, trad. 4 ed. México: McGraw-Hill, 1992. 826p.
4. Nelson RD. *et al.* *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. Clin Microbiol. Rev. 1991; 4:1-19.
5. Shepherd MG. Cell envelope of *Candida albicans*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 1987; 15:7-25.
6. Reiss E. Molecular immunology of mycotic and actinomycotic infections. Elsevier. New York. 1986. p. 191-250.
7. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow AJ. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 1968; 51:367-376.
8. Sullivan PA. *et al.* An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. Can. J. Microbiol. 1983; 29:1514-1525.
9. Arnold WN. Localisation of acid phosphatase and β -fructofuranoside within yeast envelopes. J. Bacteriol. 1972; 112:1346-1352.
10. Bano Y, Yamada Y, Nozawa Y. Secreted phospholipases of dimorphic fungus, *Candida albicans*; Separation of three enzymes and

- some biological properties. *Sabouradia J. Med. Vet. Mycol.* 1985; 23:47-54.
11. Molina M, Cenamor R, Nombela C. Exo-1,3-glucanase activity in *Candida albicans*: effect of the yeast to mycelium transformation. *J. Gen. Microbiol.* 1987; 133:609-617.
 12. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*. *Sabouradia.* 1975; 23:110-115.
 13. Ram SP. *et al.* Exo (1-3)- β -glucanase, autolysin and trehalase activities during yeast growth and germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 1984; 130:1227-1236.
 14. Ruchel R, Boning B, Jahn E. Identification and partial characterization of two proteinases from the cell envelope of *Candida albicans* blastospores. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt.* 1985; 260:523-538.
 15. Elorza MV. *et al.* Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1983; 49:457-469.
 16. Kessler G, Nickerson WJ. Glucomannan-protein complexes from cells walls of yeast. *J. Biol. Chem.* 1959; 234:2281-2285.
 17. Reiss E, Stone H, Hasenclever HF. Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan fractions of *Candida albicans* cells walls. *Infect. Immun.* 1974; 9:881-890.
 18. Yamaguchi H. Effect of biotin insufficiency on composition and ultrastructure of cell wall of *Candida albicans* in relation to its mycelial morphogenesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1974; 20:217-228.

19. Douglas LJ. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial surfaces. Crit. Rev. Microbiol. 1987; 15:27-43.
20. Douglas LJ, Houston JG, McCourtie J. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. FEMS Microbiol. Lett. 1981; 12:241-243.
21. Kulkarni RK, Hollingsworth PS, Volz PA. Variation in cell surface features of *Candida albicans* with respect to carbon sources. Sabouradia 1980; 18:255-260.
22. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect. Immun. 1981; 32:1234-1241.
23. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun. 1984; 45:6-12.
24. McCourtie J, Douglas LJ. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. J. Gen. Microbiol. 1985; 131:495-503.
25. Samaranayake LP, MacFarland TW. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin *in vitro*. Arch. Oral Biol. 1981; 26:815-820.
26. Shepherd MG. Cell envelope of *candida albicans*. Crit. Rev. Microbiol. 1987; 15:7-25.
27. Yu RJ. *et al.* Structural studies of mannans from *Candida albicans* (serotypes A and B), *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea* and *Candida tropicalis*. Can. J. Chem. 1967; 45:2205.

28. Juárez AM. Síntesis y regulación de las manoproteínas de *Candida albicans*. México: Universidad Autónoma, (tesis de graduación, Facultad de Biología) 1992. 47p.
29. Axelsen N. Quantitative immunoelectrophoretic methods as tools for a polyvalent approach to standardisation in the immunochemistry of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1973; 7:949-960.
30. Evans EGV. *et al.* Relevance of antigenicity of *Candida albicans* growth phases to diagnosis of systemic candidiasis. *Br. Med. J.* 1983; 4:86-87.
31. Syverson RE, Buckley HR, Campbell CC. Cytoplasmic antigens unique to the mycelial of yeast phase of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1975; 55:615-620.
32. Matthews R, Burnie J. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. 1988; 26:459-463.
33. Casanova M. *et al.* Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1989; 57:262-271.
34. Casanova M, Martínez JP, Chaffin WL. Identification of germ tube cell wall antigens of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 1991; 29:269-272.
35. Repentigny L, Reiss E. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6:301-312.
36. Poulain D, Hopwood V, Vernes A. Antigenic variability of *Candida albicans*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1985;12:223-270.

37. Kniker WT, Anderson CT, Roumiantzeff M. The multitest system: a standardized approach to evaluation of delayed hypersensitivity and cell-mediated immunity. *Ann. Allergy.* 1979; 43:73-79.
38. Kniker WT. *et al.* Cell-mediated immunity assessed by multitest CMI skin testing in infants and preschool children. *Am. J. Dis. Childr.* 1985; 139:840-845.
39. Becerril M. *et al.* Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. *Rev. Mex. Mic.* 1981; 1:211-226.
40. Toriello C. *et al.* Criterios para el diagnóstico de aspergilosis y candidosis sistémica. *Rev. Mex. Mic.* 1989; 2:217-225.
41. Christou NV. Anergy testing in surgical patients. *Infect. Surg.* 1983; 1:692-700.
42. Lesourd BM. *et al.* Cell mediated immunity in school children assessed by Multitest CMI skin testing II; Epidemiologic factors affecting immune responsiveness. *Ann. Allergy.* 1985; 54:446-452.
43. Christou NV. *et al.* Two techniques of measurement of the delayed hypersensitivity skin test response for the assessment of bacterial host resistance. *World J. Surg.* 1985; 9:798-806.
44. Black RE, Lanata CF, Lazo F. Delayed cutaneous hypersensitivity; epidemiologic factors affecting and usefulness in predicting diarrheal incidence in young peruvian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1989; 8:210-215.
45. Reuben JM, Hersh Em. Delayed hypersensitivity responses of cancer patients to recall antigens using a new Multitest applicator. *Ann. Allergy.* 1984; 53:390-394.

46. Corriel RN. *et al.* Cell mediated immunity in school children assessed by Multitest skin testing. *Am. J. Dis. Childr.* 1985; 139:141-146.
47. Kniker WT. Multitest CMI for standardized measurement of delayed cutaneous hypersensitivity and cell-mediated immunity; Normal values and proposed scoring system for healthy adults in the U.S.A. *Ann. Allergy.* 1984; 52:75-82.
48. Carle G. *et al.* A new device for delayed hypersensitivity skin testing. *J. Am. Coll. Nutr.* 1985; 45:515-520.
49. Delafuente JC, Hutcheson PS, Slavin RG. Evaluation of a device for delayed cutaneous hypersensitivity testing. *Clin. Pharm.* 1984; 3:518-520.
50. Kuthiala C. *et al.* Delayed-type hypersensitivity skin testing; Variance among *Candida albicans* extracts. *JAMA.* 1989; 261:1883-1884.
51. Kaminski MV. *et al.* Delayed cutaneous hypersensitivity testing as a nutritional assessment tool. *Nutr. Supp.* 1985; 5:21-23.
52. Janis EM. *et al.* Tuberculin skin test reactivity, anergy and HIV infection in hospitalized patients. *Am. J. Med.* 1996; 100:186-192.
53. Kiuchi AS. *et al.* Change points in the series of T4 counts prior to AIDS. *Biometrics.* 1995; 51:235-248.
54. Paulson E. Lignes directrices pour l'identification, l'examen et le traitement de cas de tuberculose chez les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine. *J. Assoc. Med. Can.* 1993; 148:1967-1970.

55. Whalen C. *et al.* Predictors of survival in human immunodeficiency virus-infected patients with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153:1977-1981.
56. Cayota A. *et al.* *In vitro* antioxidant treatment recovers proliferative responses of anergic CD4+ lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood.* 1996; 87:4746-4753.
57. Chin DP. Reliability of anergy skin testing in persons with HIV infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153:1982-1984.
58. Kuthiala C. Delayed-type hypersensitivity testing; Variance among *Candida albicans* extracts. *JAMA.* 1989; 261:1883-1884.
59. Eriksen NL, Helfgoit AW, Coghlan R. Cutaneous anergy in pregnant and nonpregnant womwn with HIV. Texas: University of Texas-Houston. Doc. Tec. No. 282, 1996. 1p.
60. Graham NM. *et al.* Effect of isoniazid chemoprophylaxis on HIV-related mycobacterial disease. *Arch. Intern. Med.* 1996; 8:889-894.
61. Shikuma CM. *et al.* PPD skin reactivity and anergy in HIV-infected patients in Hawaii. *Hawaii. Med. J.* 1996; 6:100-103.
62. Miller WC. *et al.* Delayed-type hypersensitivity testing in Tanzanian adults with HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1996; 3:303-308.
63. Chin DP. *et al.* Reliability of anergy skin testing in persons with HIV infection; The pulmonary complications of HIV infection study group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153:1982-1984.
64. Janis EM. *et al.* Tuberculin skin test reactivity, anergy and HIV infection in hospitalized patients. *Am. J. Med.* 1996; 2:186-192.

65. Hoffman ND, Kelly C, Futterman D. Tuberculosis infection in human immunodeficiency virus-positive adolescents and young adults. *Pediatrics*. 1996; 2:198-203.
66. Stites DP, Terr AI. *Inmunología Básica y Clínica*. Ramírez J, trad. 7 ed. México: Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., 1991. 1055p.
67. Trinder P. Glucose GOD-PAP Method. Automated Analysis. Boehringer Mannheim. *Ann. Clin. Biochem*. 1969; 6:24.
68. Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193: 265-275.
69. *Manual de Control de Calidad Microbiológico de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos*. 9º ciclo de la carrera de Químico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

13. ANEXOS

Anexo 1

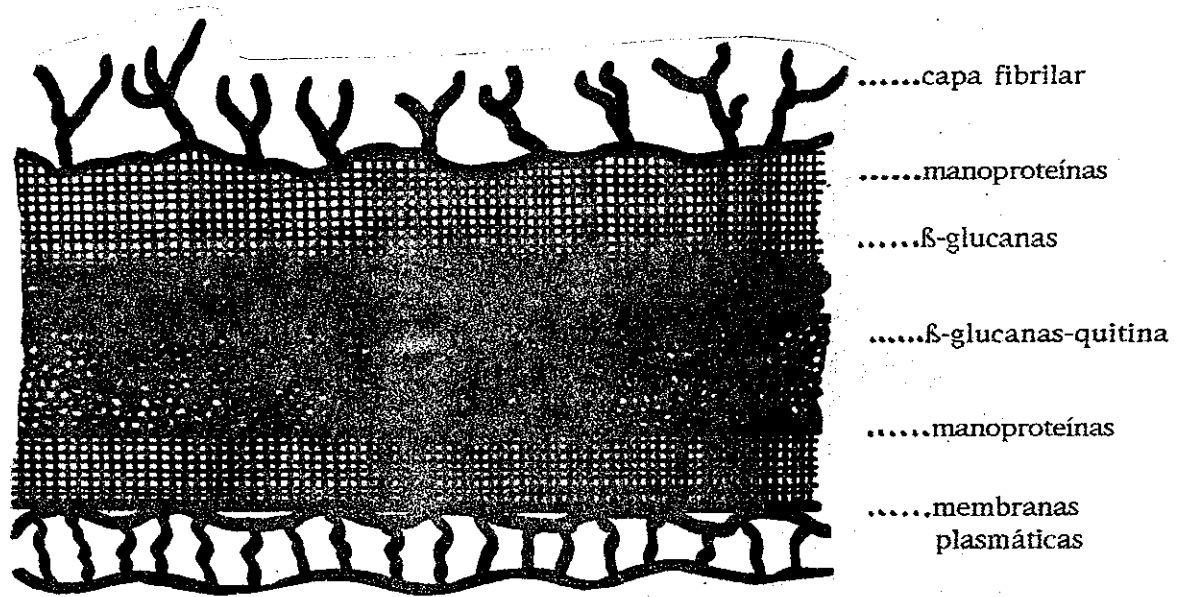
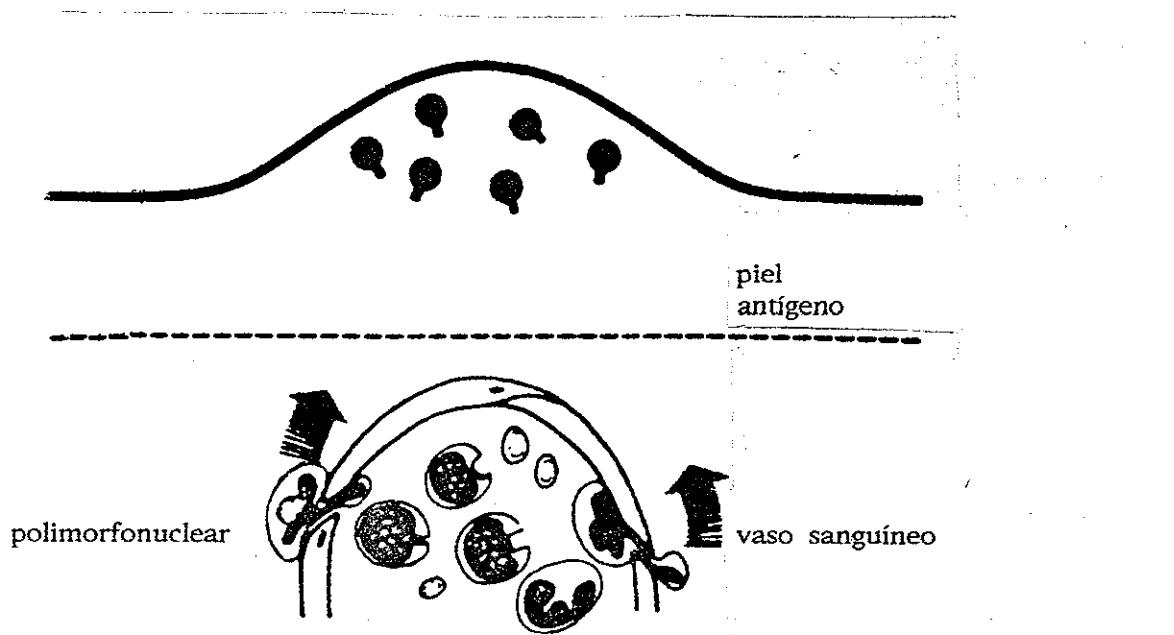


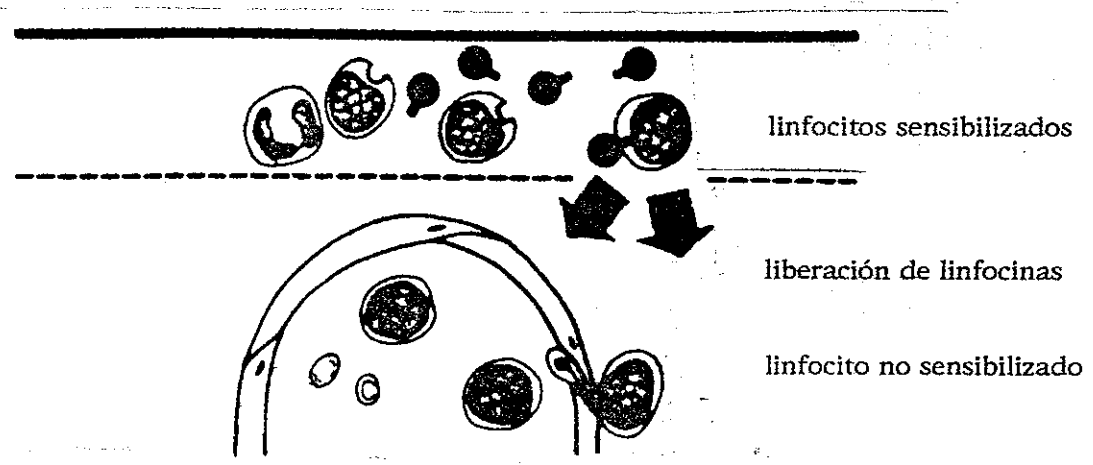
Diagrama esquemático de la arquitectura de la envoltura celular de *C. albicans*. Los componentes tales como manoproteínas se encuentran distribuidos a través de toda la pared celular. Tomado de Shepherd, 1987.

Anexo 2

Eventos en la dermis que siguen a la inyección del antígeno en la piel y provocan la induración como una medida de la respuesta. Tomado de Christou, 1983.

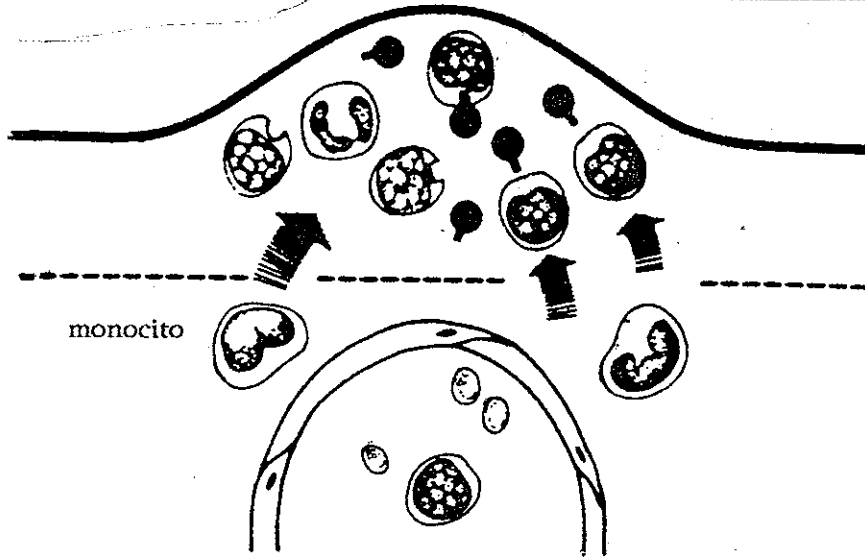


A. Antígeno depositado intradérmicamente.

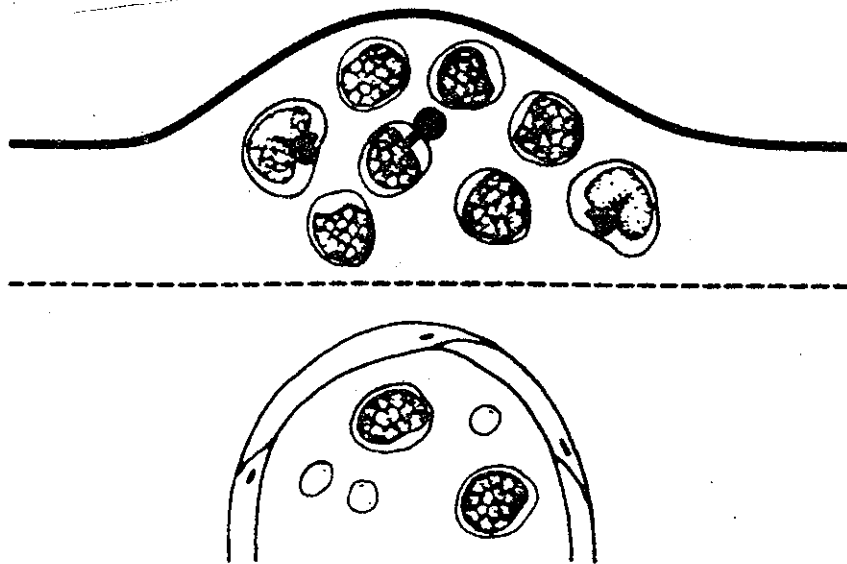


B. El antígeno se combina con linfocitos sensibilizados y como resultado se da la liberación de linfocinas.

Anexo 2, continuación...



C. Migración de macrófagos y linfocitos no sensibilizados por la atracción quimio-táctica.



D. Máxima respuesta con iniciación de la fagocitosis por macrófagos.

Anexo 3

Proveniencia de las cepas de *C. albicans*
aisladas de casos clínicos en humanos.

cepa No.	sitio anatómico
747	uña de mano
752	uña de pie
821	uña de pie
895	uña de pie

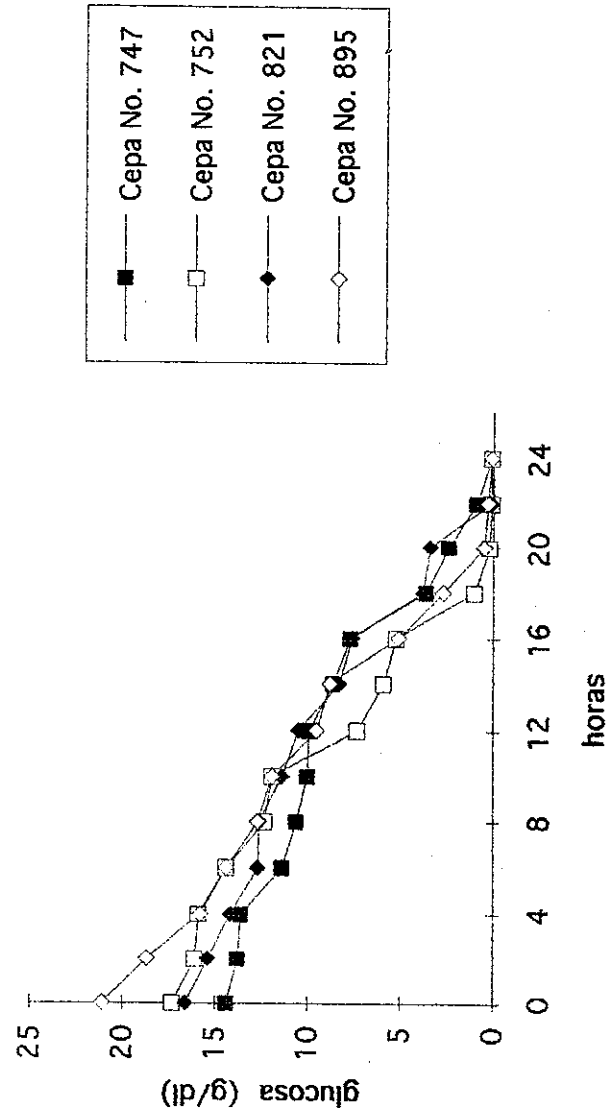
Patrones de asimilación de carbohidratos de
las cepas de *C. albicans* (API).

cepas No.	asimilación							
	glu	mal	sac	lac	gal	ino	xil	dul
747	+	+	+	-	+	-	+	-
752	+	+	+	-	+	-	+	-
821	+	+	+	-	+	-	+	-
895	+	+	+	-	+	-	+	-

glu= glucosa, mal= maltosa, sac= sacarosa, lac= lactosa, gal= galactosa,
ino= inositol, xil= xilol, dul= dulcitol

Anexo 4

Consumo de glucosa por las 4 cepas nativas de *Candida albicans*



Anexo 5

Volumen final obtenido de antígeno metabólico concentrado de cada cepa nativa de *C. albicans* y su concentración de proteínas.

No. de cepa	Volumen Final *ml	Concentración de Proteínas **ug/ml
747	5	54.72
752	4	7.17
821	4	43.43
895	5	36.08

*mililitros

**microgramos por mililitro

Anexo 6


Resultados de la prueba de IDR
usando la candidina producida en el presente estudio.

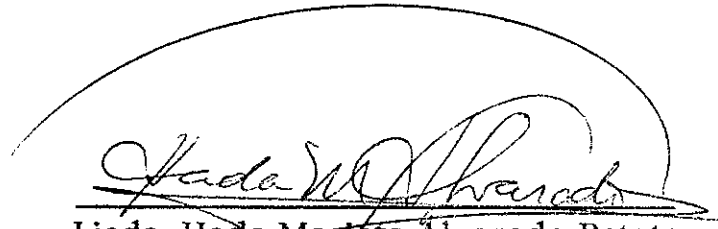
No. persona	Edad (años)	Diámetro de induración en mm*	
		24 h	48 h
1	22	7	7
2	25	8	8
3	19	7	9
4	32	7	9
5	28	10	10
6	19	7	8
7	24	7	8
8	20	6	6
9	40	8	8
10	25	8	8

* Un diámetro \geq a los 5 mm de induración es una reacción positiva al antígeno inyectado.


Ana Cecilia Díaz Ovalle
Tesisista


Licda. Ma. Luisa García de López
Asesora


Licda. Heidi Logemann Lima
Directora


Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
Decana

