



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**

**BIOTIPADO DE LEVADURAS DE INTERÉS CLÍNICO: SU
UTILIDAD COMO MARCADOR EPIDEMIOLÓGICO Y DE
VIRULENCIA.**

TESIS DOCTORAL

DIRECTORA: Dra. CARMEN RODRIGUEZ-AVIAL LOPEZ-DORIGA.



R. 22.019

CARMEN CABRONERO FERNANDEZ

MADRID, NOVIEMBRE DE 1993



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

**CARMEN RODRIGUEZ-AVIAL LOPEZ-DORIGA, PROFESORA TITULAR DE
MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID,**

INFORMA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "BIOTIPADO DE LEVADURAS DE INTERES CLINICO: SU UTILIDAD COMO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO Y DE VIRULENCIA" constituye la memoria presentada por D^a M^a CARMEN CABRONERO FERNANDEZ para aspirar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizada en este Departamento bajo mi dirección.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Madrid, a seis de octubre de mil novecientos noventa y tres.

Carmen M. Avial

Fdo: Carmen Rodriguez-Avial López-Dóriga.

A mi madre.

"Hace doscientos cincuenta años, un hombre oscuro, llamado Leeuwenhoek, curioseó por primera vez en el seno de un mundo nuevo y misterioso, poblado por millares de especies diferentes de seres diminutos: algunos de ellos, feroces y capaces de ocasionar la muerte; otros, beneficiosos y útiles y, en su mayoría, más importantes para la humanidad que cualquier continente o archipiélago."

Paul de Kruif.

Cazadores de Microbios.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que de una forma u otra habéis colaborado en la realización de este trabajo.

En especial, a la Dra. Carmen Rodríguez-Avial, con la que he compartido el camino de la investigación y las muchas facetas de la vida cotidiana, por su disponibilidad, apoyo y amistad.

También quiero manifestar mi agradecimiento al Dr. Picazo y todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología y de la Facultad: Soledad, Guadalupe, María, Marisa, Esther, Ana, y demás miembros del laboratorio, por su interés y apoyo en la realización de esta tesis.

A los Drs. José Pontón y Guillermo Quindós por la dirección y la confianza depositada en mi, y a esos amigos maravillosos de Bilbao, Angel y Javi, por su amistad.

A los Dres. MacKenzie, G. White y C.K. Campbell, gracias a quienes pude desarrollar gran parte de este trabajo, durante mi estancia en Londres.

A Juan Ramón, por hacer que germinara en mi el amor a la Micología y al Dr. Negroni, que consiguió que se hiciera grande, durante mi estancia en Buenos Aires.

A Javier, por sus excelentes conocimientos en el campo de la estadística, que han adornado esta tesis.

A Fernando y a Roberto, por sus conocimientos en informática, por su disponibilidad y horas de trabajo dedicadas.

A mis actuales compañeros de trabajo Arancha, Isabel y Josema, por su apoyo en los últimos momentos de tensión.

Especialmente, a mis padres, hermana, Pati y Martín, que desde el primer día han seguido con ilusión todo el desarrollo del trabajo, por permitirme robar parte del tiempo que les habría dedicado.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. LAS LEVADURAS COMO FLORA NORMAL	3
2. LEVADURAS ASOCIADAS CON INFECCIONES EN EL HOMBRE	4
3. DIAGNOSTICO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS	12
4. AGENTES ANTIFUNGICOS	15
5. EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES FUNGICAS	18
6. VARIACION EN LA VIRULENCIA ENTRE CEPAS	22
7. CARACTERIZACION DE LEVADURAS DE INTERES CLINICO	24
8. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS	26
9. EL PROBLEMA DE LAS VARIACIONES EN <u>C. albicans</u>	34
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIAL Y METODOS	38
1. CEPAS ESTUDIADAS	39
2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS	39
3. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS	41
3.1 METODO API 20C	41
3.2 PERFIL ENZIMATICO CON API ZYM	43
3.3 RESISTOTIPADO	45
3.4 MORFOTIPADO	47
3.5 MORFOTIPADO II	49
3.6 MORFOTIPADO EN AGAR DE SABOURAUDTRIFENILTETRAZOLIO (AST)	49
3.7 CARACTERIZACION SUBESPECIFICA EN BASE A PERFIL DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS (PSA)	50
4. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS (CMI)	52
5. ANALISIS ESTADISTICO	54
6. COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS	54
6.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS	54
6.2 DISTANCIAS ENTRE BIOTIPOS: DENDROGRAMAS DE SIMILITUD	55
6.3 RELACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS	55
IV. RESULTADOS	57
1. INCIDENCIA DE LEVADURAS DE INTERES MEDICO EN NUESTRO HOSPITAL	58

2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIFUNGICOS	59
3. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS	64
3.1 BIOTIPADO POR SISTEMA API 20C AUX	64
3.2 PERFIL ENZIMATICO	66
3.3 RESISTOTIPADO	72
3.4 MORFOTIPADO I	76
3.5 MORFOTIPADO II	78
3.6 MORFOTIPADO EN AGAR DE SABOURAUD TRIFENILTETRAZOLIO (AST)	80
3.7 CARACTERIZACION EN BASE A LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS	84
4. ANALISIS DE LOS BIOTIPOS DE 107 AISLAMIENTOS ORALES DE VIH SEROPOSITIVOS Y NO VIH	86
5. ANALISIS ESTADISTICO	88
5.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS	88
5.2 DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS: DENDROGRAMAS DE SIMILITUD	89
5.3 RELACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS	99
V. TABLAS	113
VI. DISCUSION	182
1. FRECUENCIA DE LEVADURAS EN NUESTRO HOSPITAL	183
2. SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS	187
3. TIPACION POR SISTEMA API 20C AUX	193
4. BIOTIPADO CON SISTEMA API ZYM	194
5. RESISTOTIPADO	197
6. MORFOTIPADO	199
7. METODO DE MORFOTIPADO EN AGAR DE TRIFENILTETRAZOLIO	200
8. TIPADO MEDIANTE EL PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA	202
9. VARIACIONES FENOTIPICAS EN LEVADURAS	202
10. TEORIA DEL POLIMORFISMO ADAPTATIVO	203
11. ANALISIS DE LOS BIOTIPOS DE 107 AISLAMIENTOS ORALES DE VIH SEROPOSITIVOS Y NO VIH	204
12. COMPARACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS	205
12.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS UTILIZADAS	205

12.2 DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS	207
12.3 CORRELACION ENTRE METODOS	208
VII. CONCLUSIONES	209
VIII. BIBLIOGRAFIA	212

I. INTRODUCCION

La Micología médica es una ciencia que ha adquirido un enorme protagonismo en los últimos años. Hasta la década de los 50 había muy pocas especies de hongos considerados como patógenos para el hombre. Estaban los hongos dimórficos, de distribución geográfica muy limitada, que podían causar infección por inhalación de sus esporas. También se conocían algunos hongos tropicales causantes de micosis subcutáneas, que en la mayoría de los casos no producían enfermedades de importancia, y las afecciones graves se consideraban curiosidades de áreas muy limitadas. Las micosis más comunes eran las dermatofíticas que sólo afectaban la capa córnea de la piel y sus faneras. Con la aparición de los antibióticos de amplio espectro se eliminaban no sólo las bacterias patógenas sino la flora bacteriana normal del individuo, permitiendo así la expansión de la flora normal de levaduras y otros hongos. De este modo fueron apareciendo casos de infecciones como la causada por Candida en niños tratados con tetraciclinas. Por otro lado, la utilización de esteroides evitaba la inflamación, pero suprimía la defensa celular normal con lo que algunos enfermos comenzaron a desarrollar infecciones pulmonares por Aspergillus, meningitis por Cryptococcus e infecciones de senos nasales y cerebro por Rhizopus y Mucor. También empezaron a utilizarse drogas citotóxicas en combinación con esteroides y radiación para el tratamiento de leucemias y linfomas. Esta combinación ya no sólo suprimía las defensas celulares normales sino que las destruía y esto abrió la puerta a una enorme variedad de agentes infecciosos. Ya no se trataba de hongos de distribución geográfica restringida, sino de hongos ambientales como Aspergillus, Rhizopus, y Cryptococcus. A mediados de los años 70, la lista de enfermos inmunocomprometidos se engrosó con los pacientes trasplantados y otras enfermedades como el lupus eritematoso, la sarcoidosis o la artritis reumatoide cuyos tratamientos implicaban un régimen inmunodepresivo. En la década de los 80 la aparición de enfermos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) vinieron a aumentar dramáticamente la población inmunocomprometida existente. De todas estas micosis oportunistas, las infecciones por Candida y especialmente las causadas por C. albicans son las más comunes y las que revisten mayor importancia.

El término levadura se emplea para denominar los hongos unicelulares que se reproducen por gemas y que en su estado anamórfico pertenecen a la clase Blastomycetes. Sin embargo esta definición tan general no es exacta porque algunas levaduras producen micelio o pseudomicelio bajo determinadas condiciones ambientales y nutricionales, y porque algunos hongos filamentosos como los Hyphomycetes, pueden existir en forma unicelular, reproduciéndose mediante gemas.

En su estado teleomórfico, algunas levaduras pertenecen al Subphylum Ascomycotina, otras al Basidiomycotina del Phylum Dikaryomycota, y todavía existen otras que no se sabe a que grupo sexual pertenecen y se agrupan juntas como un estado anamorfo de las Dikaryomycota, denominado Deuteromycota u hongos imperfectos (199,243).

Con esto se deja claro que el término levadura no tiene significado taxonómico y sólo es útil para describir el estado morfológico de un hongo.

La taxonomía de los hongos no es una disciplina estática y hasta los géneros y especies mejor conocidos pueden modificar su emplazamiento taxonómico con el descubrimiento de nuevas características. Las levaduras que se aíslan de muestras clínicas se encuentran siempre en su estado imperfecto (asexual), de modo que cuando aparece el estado sexual de alguna de ellas el cambio taxonómico es mucho más grande. En la práctica, la última revisión de 1983 realizada por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, permite continuar utilizando el término anamórfico (asexual) aún cuando se haya descrito su estado teleomórfico (sexual). Las últimas revisiones taxonómicas han modificado algunos géneros y especies importantes en Micología Médica. Así por ejemplo se han unido los géneros Candida y Torulopsis en uno sólo, denominado Candida. Ambos contienen especies afines a ascomicetos y basidiomicetos de forma que su separación por un simple carácter morfológico de producción de pseudohifas no parece suficientemente válida (170). Además la diferenciación entre una C. glabrata y una cepa de Candida sp. conocida, en base a la formación de pseudomicelio es fácil, pero no ocurre así en todos los casos (199). Algunos ejemplos de nombres de levaduras bien conocidas que han sufrido cambios notables en su taxonomía son, Torulopsis glabrata que ha pasado a llamarse Candida glabrata, T. candida ahora se denomina C. famata, C. parakrusei se ha incluido en C. parapsilosis, C. paratropicalis se considera como C. tropicalis y C. pseudotropicalis se llama ahora C. kefyr.

1. LAS LEVADURAS COMO FLORA NORMAL

Las levaduras constituyen una población que forma parte habitual de la flora normal de la superficie de la piel, mucosa bucal, tracto intestinal y mucosa vaginal. Las especies y número presentes varían con las distintas zonas de la superficie corporal, pero contribuye al balance de la población de un nicho ecológico particular en un individuo sano.

En 1984 Kreger-Van Rij (135) reconoció 500 especies de levaduras incluidas en 60 géneros. En conjunto existen cerca de 1000 especies de levaduras u hongos levaduriformes. La inmensa mayoría pueden ser aisladas como contaminantes de la piel, esputo, heces, u otras muestras clínicas. Esto hace que sea muy difícil determinar la importancia clínica real de un aislamiento. Solamente unas pocas especies y unos cuantos géneros han sido asociados con regularidad en la producción de enfermedades en el hombre y animales. Sin embargo cuando se trata de un huésped inmunocomprometido, el concepto varía completamente y son muchas

las especies que pueden encontrarse como oportunistas.

2. LEVADURAS ASOCIADAS CON INFECCIONES EN EL HOMBRE

Los miembros de género Candida y al menos uno del género Cryptococcus son aislados muy frecuentemente de infecciones humanas, mientras que Trichosporon, Rhodotorula y otras son oportunistas menos frecuentes. Sin embargo, incluso la levadura de la cerveza, Saccharomyces cerevisiae, se ha encontrado como causante de infecciones pulmonares (242). Así pues, en vista de la distribución tan ubicua de las levaduras no sólo en el aire, polvo o suelo, sino también en la superficie del cuerpo, en la boca, tracto intestinal y vagina, no es sorprendente que estas formas se encuentren en una amplia variedad de procesos patológicos.

Para considerar un hongo como patógeno, éste debe ser capaz de completar un serie de pasos que llevan al inicio de la infección, y contrarrestar los mecanismos de defensa tanto específicos como inespecíficos, del hospedador. Los hongos patógenos poseen diversos factores de virulencia que intervienen en el desarrollo de la enfermedad (126):

- 1.- Capacidad de adhesión a las superficies cutáneas o mucosas.
- 2.- Capacidad de penetración en los tejidos del huésped y acceso a los órganos y fluidos corporales "diana".
- 3.- Capacidad para multiplicarse "in vivo".
- 4.- Capacidad de evasión de los mecanismos de defensa del huésped.
- 5.- Capacidad para dañar los tejidos del huésped (criterio obligado para considerar patógeno a un microorganismo). Dentro de éstos, la adherencia a las superficies corporales del hospedador es un paso esencial para la colonización y posterior invasión tisular. Algunos hongos patógenos sufren transformación morfológica cuando invaden los tejidos y así, las especies de Candida pueden desarrollar pseudohifas o hifas verdaderas a partir de las blastosporas características, cuando se comportaran como patógenos (177a).

Candida albicans esta considerada como la levadura que muestra un mayor potencial patógeno para el hombre. No sólo es el principal hongo causante de infecciones vaginales y orales (muguet), sino que es capaz de invadir virtualmente cualquier tejido u órgano en pacientes inmunocomprometidos, provocando enfermedades graves de alta mortalidad (91,107,281). La transformación levadura micelio de C. albicans puede tener gran importancia en su capacidad invasora, al actuar como mecanismo de evasión de la fagocitosis, de la acción de los anticuerpos (por producirse nuevos antígenos) y de los linfocitos T.

C. albicans posee otra dos características importantes en su capacidad patógena: una alta

frecuencia de cambios fenotípicos descrita por Brown-thomsen (20) y estudiada posteriormente por Slutsky y cols. (273) y Soll (278,279,280) y la presencia de receptores de superficie para diferentes proteínas del complemento, muy similares a los de las células eucariotas. Estas dos propiedades serían factores de virulencia empleados como mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped.

Las infecciones por Candida ya fueron descritas por Hipócrates en su libro "Epidemias" donde describía cuadros de candidosis bucales en pacientes debilitados. Durante muchísimos años reinó una gran confusión en cuanto a la determinación del género donde incluir estas levaduras, durante ese tiempo el término Monilia quizá fue el más popular. Esta confusión terminó con Berkhout en 1923, quién erigió el género Candida que fue aceptado en 1954, en el VIII Congreso Botánico de París.

Todas las infecciones causadas por especies del género Candida en conjunto se denominan "candidosis" o "candidiasis" y entran dentro de las enfermedades infecciosas más comunes en el hombre. La elección de un término u otro para denominar esta infección es actualmente un tema personal. Odds (199) prefiere la denominación "candidosis", mientras que Rippon (243) opta por el término "candidiasis". Por otro lado la ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology) recomienda el término "candidosis" y el CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences) recomienda "candidiasis". Teniendo en cuenta que el sufijo -osis es el que se emplea en la sistemática de las demás micosis, en el presente trabajo a las "micosis por Candida" las denominaremos "candidosis" o infecciones por Candida (199).

La mayoría de estas infecciones están producidas por C. albicans, sin embargo, otras especies como C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata, C. kefyr, C. guilliermondii y C. krusei, aunque menos patógenas que C. albicans, han demostrado sobradamente su capacidad infectiva según los postulados de Koch (199,243,257). Aunque C. albicans es el agente etiológico más común en la mayoría de las formas de candidosis, podemos encontrar cualquier especie produciendo cualquier forma de candidosis, aunque en algunos casos puede existir alguna favorita de un tipo particular. Así por ejemplo encontramos más frecuentemente C. parapsilosis en paroniquia, endocarditis en adictos a drogas por vía parenteral y otitis externa, C. tropicalis en vaginitis, infecciones intestinales, infecciones broncopulmonares y sistémicas, y en onicomycosis. C. guilliermondii es más frecuente en endocarditis, candidosis cutánea y onicomycosis, C. pseudotropicalis en vaginitis, C. zeylanoides en onicomycosis (282).

Manifestaciones clínicas similares a las de la candidosis pueden ser producidas de igual modo por otros géneros de levaduras como Rhodotorula sp., Trichosporon sp. y otros.

Además, estos microorganismos suelen tener una apariencia similar en las secciones de tejidos por lo que el diagnóstico específico depende del aislamiento e identificación del microorganismo en cultivo.

El potencial patógeno de las levaduras varía considerablemente siendo el más virulento de todos ellos C. albicans. Bastan ligeros cambios en la fisiología de un individuo normal, para que éste comensal produzca infección. La severidad de la infección dependerá más de las alteraciones en el huésped que de las características patógenas exhibidas por el hongo. Sin embargo debido a su rápida habilidad para colonizar y tomar ventaja de cualquier tipo de alteración en el huésped, las manifestaciones clínicas de las infecciones por Candida se multiplican. La enfermedad puede ser cutánea, mucocutánea, subcutánea o sistémica, o puede implicar todas las áreas anatómicas antes indicadas. Otras especies de Candida como C. tropicalis también provocan infecciones, pero al ser menos virulentas, la gravedad de su infección dependerá de una mayor debilidad de su hospedador.

En general podemos determinar 5 condiciones que pueden alterar el equilibrio entre las levaduras y su huésped y ser suficiente para conducir a un estado patológico (153,199,241,243):

1.- RECIEN NACIDOS. Candida puede producir algunas alteraciones (eritema del pañal, muguet...), mientras se establece el equilibrio normal de la flora residente, pero en niños normales evoluciona rápidamente y a menudo sin tratamiento.

2.- CAMBIOS FISIOLÓGICOS. El embarazo parece afectar al contenido en carbohidratos de la vagina produciéndose un aumento en el recuento de Candida. Este sobrecrecimiento puede ser suficiente para producir la manifestación clínica de la vaginitis. La administración de esteroides tanto en hombres como mujeres puede originar también una proliferación de levaduras, aquí se incluiría también a pacientes con disfunciones endocrinas, como los diabéticos.

3.- ADMINISTRACION PROLONGADA DE ANTIBIÓTICOS. El efecto más importante es la alteración y eliminación de la flora bacteriana, que compite con las levaduras por un mismo nicho ecológico. Parece además que la flora anaerobia juega un papel muy importante restringiendo la población de levaduras.

4.- DEBILITACION GENERAL Y PACIENTES INADECUADAMENTE CONSTITUIDOS. En general la extensión y severidad de la infección se correlaciona con la severidad de la enfermedad de base. El término "debilitado" incluye una ligera avitaminosis de la edad, que produce el muguet, la diabetes y su asociación con la candidosis cutánea, las

vegetaciones cardíacas, consecuencia de una infección por Candida en válvulas del corazón enfermas; y candidosis sistémicas generalizadas o pulmonares que ocurren como secuela de una enfermedad crónica o como suceso terminal en varias neoplasias. La debilitación también puede ser iatrogénica. Los agentes inmunodepresivos, los agentes citotóxicos y otras drogas disminuyen la defensa normal del huésped y le predisponen a una candidosis o a la invasión por otros microorganismos oportunistas. Entre los individuos con una constitución inadecuada se incluyen aquellos con defectos inmunitarios, defectos asociados con una función anormal de los leucocitos, y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

5.- CANDIDOSIS IATROGENICA Y ROTURAS DE LA BARRERA EPIDERMICA.

En la candidosis iatrogénica, la colonización puede ocurrir en asociación con catéteres, hiperalimentación, diálisis peritoneal, técnicas quirúrgicas o simplemente por la inyección de material dentro de la piel, músculo o sistemas circulatorio o nervioso central. Los adictos a drogas a menudo desarrollan infecciones por levaduras en el lugar de la inyección, en las válvulas cardíacas, o en los ojos. Las infecciones por Candida pueden ocurrir también por una rotura accidental de la barrera epidérmica, como un trauma, quemaduras o heridas de arma blanca o pistola.

C. albicans es quizás el agente infeccioso que produce manifestaciones clínicas más variadas en el hombre. Solo la sífilis se presenta con tanta variedad de facetas clínicas como podemos encontrar en las diversas candidosis. Cualquier tejido u órgano pueden ser invadidos y la patología producida es tan variada como los síndromes clínicos. Pero además de la infección activa, C. albicans esta implicada también en varios procesos alérgicos.

Las levaduras tienen una especial predilección por las áreas húmedas, cálidas (intertrigos) y crecen bien en los pliegues de las personas obesas, entre los dedos, en los folículos pilosos tanto de personas normales como de heroinómanos, y en el área perianal. Las infecciones de piel y uñas son más comunes en diabéticos. Las lesiones al comienzo del intertrigo son vesiculopapulosas, luego crecen, se rompen y conducen a la maceración y el eritema. Las lesiones tienen un borde característico y a menudo hay lesiones satélites. C. albicans es una causa frecuente de paroniquia, aunque es común aislar bacterias junto con el hongo. También suelen aislarse otras especies como C. parapsilosis y C. guilliermondii. La paroniquia ocurre sobre todo en aquellos individuos que siempre tienen las manos mojadas: cocineros, camareros, lavanderas, y madres jóvenes. También hay una alta incidencia de paroniquia en diabéticos. El área infectada está caliente, tensa, brillante y se puede extender bajo la uña. La infección puede avanzar y decolorar la uña o incluso producir su pérdida. Se han descrito también casos de onicomycosis asociadas a C. pelliculosa (comunicación personal de Dr. Juan Ramón Maestre).

La candidosis oral suele ocurrir especialmente en neonatos, en pacientes que han estado tomando antibióticos, en adultos que inhalan esteroides y en portadores de dentadura postiza; en todos ellos la infección suele ser autolimitada.

La erupción cutánea clásica (ras) se presenta con unos parches blancos, cremosos, en la superficie de la mucosa, que sangran cuando son raspados. El diagnóstico se establece raspando las lesiones y visualizando las levaduras con un Gram, o directamente tras tratamiento con hidróxido potásico. Se pueden ver hifas, pseudohifas y blastosporas. El cultivo sólo no tiene valor diagnóstico, ya que C. albicans es un comensal habitual de la boca (65,103,130,199,289). Además de la forma clásica de candidosis oral, hay otras cuatro manifestaciones (103,243) :

1.- CANDIDOSIS ATROFICA AGUDA, considerada una secuela del muguet, que conduce a una atrofia inespecífica de la lengua.

2.- CANDIDOSIS ATROFICA CRONICA, o estomatitis protésica, que está caracterizada por una inflamación crónica y adelgazamiento del epitelio bajo la dentadura.

3.- QUEILITIS ANGULAR, una inflamación de la comisura de los labios.

4.- LEUCOPLASIA CANDIDOSICA, placas blancas firmemente adheridas a la mucosa que pueden ser precancerosas.

Hay varios estudios epidemiológicos empleando técnicas de tipado de levaduras con el fin de encontrar diferencias entre las cepas aisladas en pacientes portadores y en pacientes con infección (129,168,169,307).

Las infecciones vulvovaginales causadas por las levaduras son un problema común en todo el mundo. Se ha estimado que el 75% de las mujeres tienen al menos un episodio de candidosis vaginal durante sus años reproductivos. Aproximadamente el 90% de las infecciones son debidas a C. albicans, un 5% a C. glabrata y el 5% restante a otras levaduras. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de la infección destacan el embarazo, diabetes, mala higiene y uso de antibióticos, anticonceptivos orales, o corticoides (13). Los síntomas más comunes son picor, quemazón, sequedad, aumento de flujo y dispareuria. Existen métodos de aglutinación de partículas de látex que permiten el diagnóstico rápido de la infección y parecen diferenciar una candidosis de la simple presencia de levaduras comensales (33).

La candidosis diseminada es una infección relativamente frecuente en los últimos años debido al aumento producido en la población susceptible, como son pacientes neutropénicos, trasplantados, enfermos postquirúrgicos, quemados, recién nacidos de poco peso y enfermos con catéteres intravenosos, incluidos aquellos que reciben alimentación parenteral. La candidosis sistémica, en EEUU, es la causa del 15% de las infecciones hospitalarias y del aumento del tiempo de estancia en el hospital. Las especies más frecuentemente implicadas en estas infecciones son C. albicans, C. tropicalis, y C. glabrata (304). Sin embargo el aislamiento de levaduras atípicas en este tipo de enfermos cada vez es menos sorprendente (14,174,183,139,141,211,218,242,300).

Hay muchos factores de riesgo para la candidosis diseminada. Los antibióticos de amplio espectro son uno de ellos, C. albicans y otras levaduras son flora normal del intestino humano y están en competición ecológica con las bacterias. Se supone que los antibióticos alteran esta competición al eliminar las bacterias y permiten el sobrecrecimiento de las levaduras, su invasión del sistema circulatorio y como resultado la diseminación de la especie de levadura por éste. Los catéteres venosos centrales y los aparatos de monitorización de la presión arterial están asociados con riesgo a una diseminación de Candida. El catéter puede ser el conducto a través del cual la levadura se mueve hacia el espacio intravascular y también un nido para la agregación de organismos circulantes de una fuente endógena. C. albicans y C. tropicalis muestran una especial adherencia a los plásticos de modo que el catéter puede ser un lugar donde pueden adherirse y entonces proliferar (51,199). La hiperalimentación también es un riesgo para la candidosis diseminada, independiente del uso de catéteres intravenosos. El aumento de candidemias puede atribuirse a la hiperglucemia que estimula el crecimiento de las levaduras, y a que C. albicans aumenta su adherencia a las células humanas en altas concentraciones de glucosa (51,184,304). La cirugía abdominal podría aumentar el riesgo de candidemia al disminuir la movilidad del intestino. Además la cirugía produce rotura de la integridad de la pared y predispone a la invasión fúngica intravascular (51,3048). El factor de riesgo más importante para la diseminación hematológica de la candidosis es la neutropenia, bien cualitativa o cuantitativa (51,281).

La criptococosis es una infección crónica, subaguda o más raramente una forma pulmonar aguda, sistémica, o meningítica, causada por Cryptococcus neoformans. La criptococosis puede afectar cualquier órgano corporal, aunque los lugares predominantes para la infección son el pulmón y el SNC. La infección primaria en el hombre es casi siempre pulmonar tras la inhalación de las propágulas. La infección pulmonar generalmente cursa de forma subclínica y es transitoria, sin embargo puede producir complicaciones en enfermos debilitados y hacerse sistémica o incluso fulminante. En Europa, esta enfermedad es una señal de la existencia de alguna enfermedad de base. El agente etiológico es único entre los hongos patógenos debido a la producción de una cápsula mucilaginosa tanto en tejidos como en

cultivo. Las palomas actúan como reservorio de la infección, y el microorganismo puede aislarse de las faneras, plumas y detritus en las zonas donde viven éstas. La infección criptocócica parece más común en el hombre que en la mujer. Esto puede ser debido a que el hombre, por su trabajo, está más expuesto al ambiente en el que vive el microorganismo, aunque otra posible influencia es la diferente proporción de hormonas estrógenas existente entre ambos. En la población de inmunocomprometidos esta predisposición sexual está menos acentuada. También es interesante destacar que existen muy pocos casos descritos en la población infantil. Sin embargo se espera que los casos de criptococosis infantil aumenten con el incremento de los niños infectados con virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). Ciertas enfermedades de base como los linfomas, leucemias crónicas, sarcoidosis, tratamiento con corticoides, infección por VIH, se consideran factores de riesgo importantes para el desarrollo de una criptococosis diseminada. Los pacientes infectados por HIV son especialmente propensos a desarrollar una criptococosis diseminada. Estudios recientes sugieren que del 6 al 13 % de los individuos con SIDA desarrollan una infección criptocócica (212),(243).

Malassezia (55,141,144,160) es un hongo levaduriforme lipofílico que tiene una especial predilección por la piel del hombre y otros mamíferos. El género tiene dos especies, M. furfur y M. paquidermatis. El nombre original de estas levaduras era Pityrosporum orbiculare, y posteriormente a los distintos estados en que se encontraba la levaduras fueron denominados P. ovale y M. furfur. Actualmente se considera que las dos formas de presentarse son la misma levadura y su nombre aceptado es M. furfur. Una característica fisiológica crítica de esta levadura es el requerimiento de ácidos grasos exógenos para su crecimiento. M. furfur es bien conocida como causante de la pitiriasis versicolor, pero puede causar también otras infecciones. Ha sido también asociada con procesos seboreicos y la caspa. En los últimos años se han descrito casos de sepsis asociada a catéteres intravasculares y a la administración de lípidos intravenosos durante mucho tiempo como suplemento calórico. Se han descrito sepsis en niños y adultos, aunque en niños se da con mayor frecuencia. Los neonatos prematuros tienen un riesgo especial de infección sistémica, y es sorprendente la elevada incidencia de colonización de la piel de los neonatos por M. furfur. Aunque esta levadura es fácil de encontrar en la piel, la colonización ocurre cuando se activan las glándulas sebáceas productoras de lípidos en la superficie epidérmica, de modo que la colonización debería ocurrir en la pubertad. Los factores que pueden predisponer esta colonización prematura de los neonatos pueden ser su menor edad gestacional, y el tiempo de estancia en la UCI, pero no la administración intravenosa (IV) de lípidos. Las manifestaciones clínicas son muy diversas, y la infección sistémica causada por M. furfur depende mucho del hospedador. Así pues, M. furfur se ha unido al grupo de patógenos oportunistas causantes de enfermedades infecciosas sistémicas muy graves.

Rhodotorula (102,199,243,250) es un contaminante habitual de la piel, pulmones,

orina, y heces. Su aislamiento en esputo no suele tener significación clínica. En hemocultivo, si se ha descartado la contaminación tiene más significado. Es una levadura mucosa, roja, encapsulada y que raramente produce micelio. Se ha aislado en algún caso en enfermos en estadios terminales de enfermedades debilitantes. De ellas R. rubra es la especie más veces aislada en infecciones fatales de pulmón, riñón y SNC. Es causa de peritonitis en pacientes en diálisis continua ambulatoria (250). Los casos de fungemia causada por Rhodotorula a menudo son debidos a colonización de catéteres, soluciones intravenosas, bancos de sangre, y máquinas de diálisis contaminados. La eliminación de la fuente de infección hace desaparecer los síntomas y sólo algunos casos requirieron tratamiento con anfotericina B (102). Rhodotorula también ha sido implicada en dos casos de endocarditis, en una meningitis en un paciente con una leucemia linfoblástica y en un caso de afectación de médula ósea en un paciente con leucemia (232,243).

Las especies de Trichosporon, especialmente T. beigelii (T. cutaneum) y T. capitatum (92,124,163,178,199,211,241,243,299,303) son componentes minoritarios de la flora normal de la piel y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. T. beigelii se asocia normalmente con los nódulos de la piedra blanca, pero esta especie y en menor grado T. capitatum se han descrito como causantes de una amplia variedad de micosis oportunistas (241,243,299). El primer caso, descrito en 1970, fue un paciente con carcinoma bronquial que desarrolló un absceso cerebral (303). Después se han descrito casos de endoftalmitis tras cirugía, endocarditis, edema pulmonar, septicemia en un trasplantado renal. Casi todos los casos de infección invasiva están asociados con tratamientos inmunosupresivos para leucemia u otras neoplasias y más recientemente con adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y trasplantes de órganos. (178,211,241,243,303).

Existen todavía otros géneros y especies de levaduras que en raras ocasiones también pueden implicarse en infecciones humanas y animales. Kluyveromyces fragilis es una especie de amplia distribución en la naturaleza sobre todo en plantas y frutas en descomposición, sin embargo se ha descrito como productora de una neumonía en un enfermo de 51 años trasplantado de corazón (151). El paciente se curó con anfotericina B. Sporobolomyces que crecía muy abundantemente en unas astillas de madera fue capaz de producir una dermatitis. S. cerevisiae (10) ha sido implicado en varios casos de infección pulmonar especialmente en bebedores de cerveza. También se ha descrito un caso de infección postoperatoria y Eng y col. (62) hacen una revisión de 13 casos de infección por S. cerevisiae. S. carlsbergensis y S. pastorianus han sido implicados en micosis de estómago (62). Hansenula polymorpha fue aislada de nódulos linfáticos del mediastino en un enfermo que padecía una enfermedad granulomatosa crónica de la niñez. También ha sido implicada en 52 casos de colonización en neonatos (186). La literatura describe un caso de endocarditis por Pichia ohmeri, y varias infecciones por Debaryomyces hansenii (243).

3. DIAGNOSTICO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

El laboratorio de Microbiología puede recibir muchos tipos diferentes de muestras de los pacientes con infecciones por levaduras debido a la amplia variedad de formas clínicas que presenta dichas infecciones. El aislamiento de una levadura en cultivo es la prueba más definitiva y sensible de la presencia de levaduras en una muestra. El examen microscópico directo de las muestras sospechosas tiene un valor adicional, pero resulta un método menos sensible que el cultivo en la mayoría de las muestras. El examen microscópico directo para la búsqueda de levaduras en fluidos se hace por montajes en fresco de una porción de fluido cubierta con un portaobjetos. También se pueden emplear tinciones como el Gram donde las levaduras son Gram-positivas. Las muestras de escamas de piel y uñas se observan añadiendo unas gotas de KOH al 10% que deshace la queratina y permite una mejor visión de las levaduras presentes en la muestra. En muestras de tejidos de biopsia se hacen cortes histológicos y se emplean técnicas de tinción también utilizadas en bacterias como Zielh, PAS, Gomori y metenamina de plata entre otras (199,263).

Para el aislamiento de levaduras de lugares superficiales como orofaringe, genitales y piel se utilizan comúnmente torundas de algodón. Las muestras obtenidas con torunda deben enviarse lo más rápidamente posible al laboratorio para evitar su desecación. Aunque las levaduras pueden resistir 24 h sin perder su viabilidad en una muestra húmeda, es aconsejable utilizar un medio de transporte para evitar la pérdida de humedad, por si ocurre una demora en su llegada al laboratorio. Las muestras de piel también se obtienen por raspado con un bisturí estéril o con tiras adhesivas (199,247,263). Los hemocultivos para aislamiento de levaduras a menudo dan falsos negativos y pueden necesitar 15 días de incubación para que el resultado sea positivo (89,180,181). Las levaduras crecen mejor en medios ventilados (187), de ellos el método de lisis-centrifugación parece ser el que aísla mayor número de levaduras (106,180,187). Las muestras de heces se siembran directamente sin ser tratadas en un medio de agar para levaduras. Las muestras de esputo, orina y líquido cefalorraquídeo o peritoneal se procesan sembrando volúmenes conocidos del fluido, si se desea una estimación cuantitativa del número de levaduras existentes en la muestra, o se centrifugan y se siembra el sedimento si se desea maximizar la sensibilidad en la detección de pequeños números de levaduras. El significado patológico de las levaduras en esputo es generalmente dudoso ya que su presencia no proporciona evidencia diagnóstica de infección pulmonar por levaduras (263).

Los medios de agar más popularmente utilizados para el aislamiento de levaduras patógenas, son las versiones de glucosa-peptona conocidas como agar glucosado de Sabouraud. Para el mejor aislamiento de las levaduras se puede inhibir el crecimiento de las bacterias incorporando al medio antibióticos antibacterianos, como cloranfenicol o

gentamicina. La cicloheximida o actidiona no debe añadirse a estos medios de aislamiento primario de levaduras porque inhibe muchas levaduras como C. glabrata, C. krusei y C. parapsilosis que pueden ser los agentes causales (199,243).

Como C. albicans es la más importante de las levaduras en patología humana, se han desarrollado muchas técnicas para su identificación rápida. Una de las más empleadas es la producción de tubo germinativo en suero que permite su identificación en 2-3 horas (170,199,243). Algunos sueros son poco inductores de germinación y por eso se aconseja la utilización de mezclas de varios sueros. Se han descrito algunas cepas de C. albicans que no producen tubo germinativo y algunos casos de C. tropicalis que sí lo producen. Para una buena utilización de esta prueba hay que saber distinguir el tubo germinativo que es una prolongación de la blastospora madre, de una pseudohifa que tiene un tabique de constricción en su unión a la blastospora (199,243). La producción de clamidosporas es otra característica específica de C. albicans, al menos entre las levaduras encontradas en el hombre (243), ya que también se ha visto que las producen C. australis encontrada en un pingüino, C. clausenii muy raramente encontrado como saprofito y ocasionalmente cepas de C. stellatoidea y C. tropicalis. Los medios más utilizados para ello son el agar de "corn-meal" con Tween 80 al 10% y agar de arroz. Estos medios no sólo inducen la formación de clamidosporas sino que también inducen la formación de pseudomicelio, micelio y artrosporas y permite el estudio morfológico, muy importante en la determinación de especie.

Para la identificación definitiva de un aislamiento de levaduras a nivel de especie se requiere estudiar sus propiedades fisiológicas. Tradicionalmente estas características se determinaban en base a la capacidad de asimilar y fermentar algunos compuestos de carbono y nitrógeno (7,132). La asimilación de azúcares puede determinarse por auxanograma en agar Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco), utilizando discos impregnados con cada azúcar o en medio líquido sometidos a agitación que es más sensible y específico pero necesita más tiempo de realización. Las pruebas de fermentación de azúcares con producción de CO₂ en medio líquido se realiza incorporando una campana Durham invertida dentro de los tubos (243). Actualmente estas técnicas tan laboriosas se realizan en Centros de Referencia y para la rutina de los laboratorios de Microbiología Clínica se han desarrollado métodos comerciales que ofrecen una buena identificación de las levaduras de una forma más rápida y sencilla (52,243). De los métodos comerciales existentes el API 20C (BioMérieux, Francia) es el más conocido. Tanto estos dos métodos como el API 50H (BioMérieux, Francia), Minitek (BBL Microbiological Systems, USA), Uni-Yeast-Tek (Flow Laboratories, USA), Mycotube (Roche), -Auxo-disc- (Pasteur, Francia) basan la identificación de un aislamiento desconocido en su perfil de asimilación de hidratos de carbono (127,137,190,255,256). La lectura la realiza el microbiólogo teniendo en cuenta la aparición de turbidez o los cambios de color debido a indicadores de pH (52). En otros sistemas como el Quantum II (Abbot Laboratories,

USA), Automicrobic System (Vitek System, USA) y MicroScan (Baxter, USA) (52,96,138,140) el patrón de carbohidratos es leído automáticamente, los perfiles son comparados en la base de datos de la computadora y el sistema de la identificación por escrito.

Otras alternativas para la identificación de levaduras estas basadas en las diferencias antigénicas existentes entre especies, en el que se basa el método Candida-Check (Fernández Moluie RIAM) que utiliza la serología para la identificación (82). También existen métodos de identificación basados en la detección de actividades enzimáticas de la pared celular, como es el caso del método Yeast-Ident (BioMerieux, Francia), que ha demostrado poca exactitud y necesita ser rediseñado. El último sistema de identificación introducido en 1986, American Microscan (Baxter) se basa también en el perfil enzimático (140). La lectura, que es automática, se hace por cambios de color producidos por hidrólisis enzimática de 20 a 34 sustratos. Las levaduras clínicamente más relevantes pueden identificarse 4 h después de su inoculación. Otras alternativas de identificación están basadas en el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción del ADN, análisis de cromatografía de gases de metabolitos producidos por las levaduras, sensibilidad de los aislamientos de levaduras a una gran variedad de inhibidores químicos, tinción diferencial e inhibición de las colonias de levaduras en medios que contienen verde jano, cambios de color cuando se añade al medio una gota de solución de sal de diazonio y diferenciación de levaduras por isoenzimas detectadas mediante electroforesis (199).

Hay autores como Kreger-Van Rij (132) y Barnett y cols (7) que ofrecen en sus libros una clave muy completa para la identificación de levaduras que no se puedan identificar por otros métodos más rápidos y sencillos, siguiendo sus patrones de asimilación y fermentación acompañados de sus características morfológicas y fisiológicas (7, 132). El aislamiento del agente causal, no es fácil en muchos casos de infección micótica sistémica. El hemocultivo en estos casos no suele ser de gran utilidad ya que puede ser negativo en un gran número de pacientes con micosis sistémicas y cuando es positivo puede ser debido a una fungemia transitoria. Además la ausencia de una sintomatología patognomónica hace que en un gran número de pacientes la infección se diagnostique demasiado tarde para la instauración de un tratamiento eficaz o quede sin diagnosticar (89). En estos casos el diagnóstico serológico sería de gran utilidad, si fuese capaz de discriminar entre los niveles de antígeno o anticuerpo presentes en el suero de individuos sanos o de enfermos con infección por levaduras, en unos como resultado de la presencia de levaduras como flora normal y en los otros como resultado de la infección sistémica.

Existen métodos comerciales de probada utilidad para la detección de antígenos de Cryptococcus neoformans (Crypto-latex) y de C. albicans (Cand-Tec) (75,106,180,181). Una

de las posibilidades más estudiadas en la actualidad es la detección de antígenos o de anticuerpos frente a estos que se expresen durante el desarrollo de la acción patógena de la levadura. La detección de antígenos de la fase micelial tendría valor diagnóstico de micosis diseminada ya que la transición de levadura a micelio ocurre cuando se produce infección (181,230,231,233,234,235). Sin embargo, incluso los procedimientos serológicos más sensibles a veces no resultan de utilidad en individuos inmunodeprimidos y la atención se ha concentrado en métodos para la detección de productos del hongo más que de productos del hospedador. En este sentido se está intentando utilizar con fines diagnósticos la detección de metabolitos como arabinol y manosa. Se han hecho pues grandes avances en el diagnóstico de las micosis sistémicas, pero todavía no existen pruebas que permitan el diagnóstico rápido en todos los casos de infección fúngica, sobre todo en pacientes neutropénicos (230).

4. AGENTES ANTIFUNGICOS

Aunque las micosis sistémicas se conocen desde hace mucho tiempo, no se ha encontrado un tratamiento eficaz para combatir las hasta hace tres décadas. Contrariamente a lo ocurrido con la terapéutica antibacteriana, los avances en el tratamiento de las enfermedades micóticas han sido lentos, a pesar de que en los últimos años se ha registrado un incremento sustancial en su frecuencia de aparición. Siguiendo la clasificación de Kerridge con algunas modificaciones (258), los agentes antifúngicos más importantes en clínica o con más perspectivas de uso futuro, pueden agruparse en base a su mecanismo de acción, dependiendo de que actúen sobre el núcleo, la membrana citoplasmática o la pared celular. Otros lugares de acción de drogas experimentales pueden ser el ribosoma, la mitocondria, inhibición de rutas metabólicas o la acción de agentes quelantes.

El más común de los antifúngicos que actúan a través del núcleo es la **5-fluorocitosina** (5FC), su acción primaria es inducir la síntesis de ARN defectuoso en células susceptibles que son capaces de transportar la 5FC al interior de la célula por medio de una citosina permeasa. Este efecto parece ser específico para el hongo y no para las células de mamíferos en razón de la poca o ninguna actividad de la citosina deaminasa en estas últimas, por lo que su empleo como antifúngico podría estar garantizado. No obstante, la 5FC ha resultado efectiva sólo en un grupo restringido de micosis: frente a C. neoformans, Candida y algunos hongos que causan cromoblastomycosis, así como frente a algunas cepas de Sporothrix y de Aspergillus. Además, genera una alta proporción (5-10%) de mutantes resistentes en C. albicans, donde alrededor de un 10% de los aislamientos son resistentes de forma primaria, probablemente por deficiencias en algunas de las enzimas involucradas en la incorporación de la 5FC al metabolismo celular. Estos factores limitan seriamente su uso como antifúngico

5306060925

de elección en terapéutica antimicótica. La combinación de flucitosina y anfotericina B es la terapia recomendada en el tratamiento de la meningitis criptocócica, y esta combinación parece ser superior en eficacia a la anfotericina B sola en el tratamiento de las infecciones invasivas por Candida y Aspergillus (74,91,176,199,269).

La **griseofulvina** es quizás el más antiguo de los antifúngicos todavía en uso bajo administración oral como agente contra infecciones producidas por dermatofitos: Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton. Se aisló en 1939 a partir de varias especies de Penicillium, fundamentalmente Penicillium griseofulvum. Aunque su mecanismo de acción no ha sido definido con precisión, parece que actúa provocando la disrupción del huso mitótico en la célula fúngica, razón por la cual la hemos ubicado dentro de los antifúngicos que actúan a nivel del núcleo. Este agente antifúngico se administra por vía oral y se absorbe en relación directa con el contenido de grasas de la alimentación, aumentando su biodisponibilidad cuando se ingiere con alimentos grasos como la leche. Se metaboliza en el hígado formándose un compuesto inactivo (6-desmetilgriseofulvina) que se excreta por el riñón. La griseofulvina está exclusivamente indicada en el tratamiento de las tiñas ungueales, del pelo y del cuerpo que no responden al tratamiento local. Carece por completo de actividad frente a levaduras, Candida y Pityrosporum y otros hongos, como Herdersonula, Scytalidium o Scopulariopsis (243,258).

Los agentes antifúngicos que actúan a nivel de la membrana citoplasmática son los de uso más extendido en estos tiempos. Resulta sorprendente el hecho de que dada la aparente similitud entre las estructuras y funciones de las membranas citoplasmáticas en organismos eucariotas inferiores y superiores, sea ésta la que proporcione el blanco más significativo de las drogas antimicóticas más importantes en clínica actualmente. Los polienos como la **anfotericina B** de uso parenteral y la **nistatina** de uso tópico u oral, actúan sobre la integridad física de la membrana. Su mecanismo de acción está basado en el enlace que éstos establecen con los esteroides de la membrana citoplasmática de eucariotas, provocando auténticos agujeros por donde se pierden componentes del interior celular. Debido a su lugar de acción daña también las células mamíferas que por ser eucariotas, comparten la fracción de esteroides, ergosterol en hongos y colesterol en eucariotas superiores. De aquí se desprende la principal limitación en el uso de los polienos.

La anfotericina B es producida por Streptomyces nodosus, a las dosis habituales se comporta como fungistática, logrando actividad fungicida cuando se emplean concentraciones muy elevadas. Continúa siendo el antifúngico de elección en la mayoría de las micosis (176,212,214). La anfotericina B es eficaz frente a los microorganismos que componen los géneros Candida, Aspergillus, Histoplasma, Coccidioides, Paracoccidioides, Cryptococcus, Mucor, Sporothrix, Blastomyces y Fusarium (199,243). sin embargo, se han encontrado cepas

resistentes del género Aspergillus, así como de C. lusitaniae, T. beigelii y Geotrichum sp y numerosos hongos dematiáceos (14,218,219a,298,211). La anfotericina B es el único antifúngico poliénico disponible para el tratamiento sistémico de las micosis invasivas y permanece como el fármaco de elección en la aspergilosis diseminada, aspergilosis pulmonar necrotizante, aspergiloma, mucormicosis, esporotricosis diseminada extracutánea, blastomicosis, histoplasmosis diseminada, coccidioidomicosis diseminada y endocarditis por Candida. Es el fármaco de segunda elección en la paracoccidioidomicosis y en la criptococosis diseminada, meningitis criptocócica y candidiasis hepatoesplénica. La administración intratecal de anfotericina B debe añadirse en la meningitis por Coccidioides y en la meningitis criptocócica que no responde a la anfotericina B por vía intravenosa (91,176).

La nistatina fue obtenida en 1950 a partir de Streptomyces noursei. Por su mecanismo de acción semejante a la anfotericina B se comporta como fungistático o fungicida según la concentración, frente a diversas especies de hongos levaduriformes, filamentoso y dimórficos (Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Blastomyces, Aspergillus etc) (249,258).

Los antifúngicos que actúan sobre la síntesis de ergosterol en la membrana constituyen el grupo más reciente de drogas antifúngicas desarrolladas en algunos laboratorios. Dentro de ellos existen dos subgrupos. El primer grupo incluye los inhibidores de la escualeno epoxidasa, alilaminas como el naftifina y terbinafina y tiocarbamatos como el tolnaftato. Estos agentes tienen buena actividad tópica frente a dermatofitos pero poca frente a C. albicans. El segundo grupo incluye los antifúngicos azoles que actúan inhibiendo la demetilasa del lanosterol, dependiente del citocromo P-450, con lo cual el lanosterol se acumula y no puede reemplazar el ergosterol de la membrana produciéndose una inhibición del crecimiento. Los azoles se subdividen en imidazoles (miconazol, econazol, ketoconazol, clotrimazol, bifonazol, tioconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol y terconazol). La mayoría de ellos son de uso tópico mientras que el ketoconazol, itraconazol y fluconazol también son de uso oral en dermatofitosis, candidosis, criptococosis y aspergilosis entre otras. También se ha usado de forma parenteral el miconazol, itraconazol, saperconazol y fluconazol. El miconazol, fue el primero de este grupo disponible para ser administrado por vía parenteral. Es un fungistático de amplio espectro que se muestra muy activo frente a dermatofitos, levaduras, mohos y otros hongos como Malassezia furfur. Sin embargo la absorción de miconazol tras su administración oral es pobre. El ketoconazol ha sido el primer antifúngico imidazólico potente que administrado por vía oral se ha mostrado eficaz en el tratamiento de algunas formas de coccidioidomicosis. El ketoconazol es activo frente a un amplio rango de hongos. Su espectro de actividad comprende dermatofitos, levaduras (Candida, C. neoformans) y hongos dimórficos. sin embargo, Aspergillus y C. tropicalis no parecen ser sensibles a la acción antifúngica del ketoconazol (91,243,176).

La gran limitación de estos antimicóticos es que también interfieren la interconversión de esteroides en mamíferos. Por este motivo, en los pacientes sometidos a tratamiento con estas drogas se observa una disminución importante de los niveles de testosterona. No obstante estudios recientes sugieren que el itraconazol y el fluconazol interfieren menos porque el citocromo P-450 de los mamíferos resulta menos sensible que su análogo en los hongos (199,258). Es interesante comentar que es difícil correlacionar los resultados obtenidos "in vitro" e "in vivo" con los azoles, especialmente con el fluconazol, que pudo ser descartado como posible agente antimicótico de haber considerado sólo los datos observados "in vitro" (213,240,248,290). La aparición de algunos aislamientos resistentes a ciertos azoles, si bien todavía no es alarmante, debe ser un elemento de alerta en el uso racional de estas drogas en terapéutica antifúngica (199,249).

Los efectos nocivos de los polienos y el precario equilibrio enzimático que regula a los azoles, las alilaminas y los tiocarbamatos, así como el estrecho rango de hongos susceptibles, estimulan el desarrollo de nuevas líneas de investigación en este área. Se está experimentando con drogas como la **cianafina** y la **ramihifina A** que actúan a nivel de membrana. Otra línea igualmente promisorias de investigación en agentes antimicóticos, se ha centrado en el uso del **ajo (*Allium sativum*)** y algunos de sus extractos como antifúngicos (150,199,258). Los extractos de ajo poseen actividad "in vitro" frente a un gran número de hongos incluyendo levaduras, a la vez que confieren una protección "in vivo" frente a infecciones micóticas experimentales. El componente activo del ajo parece ser la alicina. Su mecanismo de acción no ha sido precisado todavía, aunque se ha postulado su acción inactivando grupos tioles en las proteínas esenciales y su posible implicación en la inhibición de la síntesis de lípidos (258).

Desde un punto de vista teórico, los antifúngicos que actúen a nivel de pared celular serían altamente específicos ya que esta estructura no existe en las células de mamíferos. Las investigaciones en este campo están identificando inhibidores de la síntesis de quitina (**polioxina D**, **nikkomicina Z**) e inhibidores de la síntesis de glucanos (**papulacandina B**, **cilofungine**), los cuales están todavía en etapa experimental.

5. EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES FUNGICAS

Es difícil obtener datos de la incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas nosocomiales. Los datos más representativos los aporta el CDC en su NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance). En 1984, de 26.965 infecciones, se identificaron patógenos en el 84%, Candida fue el octavo patógeno nosocomial más común encontrado en

el 5,5% de todos los aislamientos. La categoría de "otros hongos" se encontró en undécimo lugar representando el 1,7 % de todos los aislamientos nosocomiales (304). En EEUU, aproximadamente el 5% de todos los enfermos hospitalizados desarrolla una infección nosocomial. Los costos asociados con estas infecciones se estima en más de un millón de millones de dólares americanos por año. Aunque las bacterias son los agentes etiológicos más importantes en las infecciones de origen hospitalario, los hongos son hoy en día patógenos nosocomiales muy significativos (175,187,217,218,281).

La incidencia de Candida como patógeno nosocomial está aumentando como demuestran los datos NNIS. En el período de 1980-1982, Candida representó el 4,5% de todos los patógenos nosocomiales, comparado con el 5,5% en 1983. Las infecciones nosocomiales fúngicas parecen ocurrir con frecuencia en los servicios de medicina interna, cirugía y pediatría, más frecuentemente en pacientes atendidos en UCI, comparados con los no atendidos en estas unidades. Los hongos son patógenos nosocomiales relativamente más frecuentes en Oncología (85,107,110,197). En hospitales especializados en Cáncer los hongos han aumentado las infecciones nosocomiales y la mortalidad. Datos obtenidos del National Cancer Institute revelan que el 22% de los pacientes que murieron entre 1954-1958 eran por infecciones fúngicas, comparado con el 43% en el período 1959-1964. Por otro lado un estudio realizado de las fungemias en el Memorial Sloan-Kettering Center Institute comparando los períodos 1974-1977 y 1978-1982, el aumento de episodios de fungemia fue del 30,6% por año (304). Según datos del Centro para el Control de la Infección de Atlanta en la década de 1980-1990, las especies de Candida produjeron el 72,2% de las infecciones nosocomiales fúngicas (218). Los hongos son una importante fuente de morbilidad y mortalidad en pacientes oncológicos y en trasplantados (2). Las infecciones por hongos representan el 20-30% de las infecciones fatales en leucémicos, el 10-15% de las infecciones mortales en enfermos con linfomas, y sólo el 5% en pacientes con tumores sólidos. Los hongos son también una causa importante de mortalidad en enfermos renales, cardíacos, y trasplantados de médula ósea (89,304).

En las infecciones nosocomiales, C. albicans ha causado numerosos problemas sobre todo en neonatos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y aquellos que sufren quemaduras severas o cáncer (295). Incluso utilizando profilaxis antifúngica, un 4,1% de los pacientes quemados desarrolló candidemia y un 50% de ellos murieron (304). En nacidos prematuros se han descrito entre 0,9-3,8% de candidosis invasivas asociadas con una alta mortalidad. En leucémicos la incidencia de candidosis invasivas es mayor llegando a un 15% y con una mortalidad del 92%.

Por este motivo la utilidad mas importante de los métodos de tipado es la investigación de brotes de candidosis invasivas. Burnie y cols fueron los primeros en investigar un brote

de candidosis invasiva ocurrida en una unidad de cuidados intensivos del London Hospital. Emplearon una combinación de serotipado, morfotipado y biotipado y concluyeron que todos los casos habían sido producidos por la misma cepa de C. albicans, que esta cepa había causado el 44% de las infecciones superficiales de dicha unidad y el 17% de las infecciones superficiales por Candida del hospital (142,166). Dicha cepa fue aislada en dos ocasiones de las enfermeras por lo que llegaron a la conclusión de que el brote había sido diseminado a través de las manos de las enfermeras. Además dicho brote terminó cuando se instauraron mejores técnicas de lavado de las manos. Sin embargo, estudios posteriores realizados con estos aislamientos demostraron que utilizando un método de tipado basado en el perfil de fragmentos de DNA tratados con enzimas de restricción se encontraban 5 tipos diferentes cuando se suponían todos los aislamientos iguales (283). Del mismo modo utilizando el morfotipado de "Phongpaichit" otros autores encontraron morfotipos diferentes entre dichas cepas supuestamente indistinguibles lo cual ha puesto en duda los métodos de tipado originales (119).

También se ha investigado la epidemiología de otras infecciones hospitalarias. Las infecciones superficiales causadas por Candida causaban grandes trastornos en los pacientes con carcinoma sometidos a radioterapia lo cual llevó a McCreight (169) a realizar los resistotipos de las C. albicans aisladas antes y después de la radioterapia. Observaron que antes del tratamiento casi no se aislaban levaduras en la piel y que después las cepas que colonizaban la piel eran idénticas a las que desde el principio colonizaban la boca, lo cual indicaba que la infección probablemente era endógena. Sin embargo, en 4 pacientes tratados en un mismo lugar, se encontró un resistotipo que en general era poco frecuente y que no lo tenían los enfermos tratados en otro lugar. Esto sugirió que quizás la infección cruzada podía tener importancia en la epidemiología de las infecciones por C. albicans en estos pacientes. Otro estudio posterior utilizando el método del resistotipado no encontró ninguna asociación de un resistotipo particular entre las C. albicans aisladas de pacientes con cáncer y los controles de personas sanas (85).

Odds y cols (201) estudiaron a lo largo de 9 meses 153 pacientes con trasplante de médula o quimioterapia y observó una marcada estabilidad entre los biotipos de C. albicans que portaban dichos individuos y decidió que las infecciones cruzadas no eran un hecho frecuente. Utilizando una combinación de resistotipado y morfotipado, Hunter y cols (117) estudiaron la colonización de pacientes y de enfermeras en una unidad de cuidados intensivos durante 4 meses. Durante ese tiempo no hubo ninguna infección por Candida de importancia. Todos los pacientes menos uno estuvieron colonizados por la misma cepa durante su estancia en dicha unidad, mientras que las enfermeras a menudo eran colonizadas por más de un tipo. Las cepas aisladas de las manos de las enfermeras eran del mismo tipo que las que colonizaban a sus pacientes, mientras que las cepas aisladas de la cavidad oral de las

enfermeras generalmente eran diferentes de las de sus pacientes. Llegaron a la conclusión que la infección cruzada de C. albicans en las unidades de cuidados intensivos era un fenómeno frecuente.

Otro tipo de estudio sobre la epidemiología de la infección por Candida la realizó Blaschle-Hellmessen que utilizando un método de tipado combinado estudió cepas de C. albicans que colonizaban a madres y sus bebés. Encontró que todos los recién nacidos y el 95% de los lactantes portaban tipos indistinguibles de los de sus madres, lo cual confirmaba la creencia de que los niños adquirían las levaduras de sus madres (119). Amalia del Palacio (209) estudió los biotipos de las cepas aisladas de 21 heroinómanos que padecían candidosis diseminada y encontró que todos tenían el mismo biotipo, que eran resistentes a citrato y crecían especialmente bien en limón con lo que llegaron a la conclusión de que la fuente de infección era el limón con el que cortaban la droga.

La candidosis oral es extremadamente común en los pacientes con SIDA (88), a pesar de la gran importancia de esta enfermedad hay relativamente pocos estudios de tipado para analizar las levaduras encontradas en dichos pacientes. Se han realizado algunos estudios para intentar encontrar algunas diferencias entre los tipos de que colonizan los pacientes inmunodeprimidos y los que portan los inmunocompetentes y no encontraron grandes diferencias (129,165).

Candida no sólo es relevante en el ambiente hospitalario, sino que a nivel extrahospitalario existen otras infecciones como la vulvovaginitis que aunque leve, es extremadamente común y puede causar muchas molestias a quien lo padece y a sus familiares (200,99). Se piensa que hay factores predisponentes implicados en la etiología de esta infección y que en la mayoría de los casos es debido a una infección endógena. Se han utilizado los métodos de tipado de levaduras para confirmar estas teorías y efectivamente, se ha observado que los aislamientos de C. albicans que causan una infección vaginal son del mismo tipo que aquellas que colonizan el aparato digestivo de dichas pacientes (112,191,201,283,302). Además parece existir cierta transmisión sexual ya que se han encontrado los mismos tipos de levadura en las parejas sexuales de las pacientes infectadas (167,283,301,302). Odds también ha sugerido que la mayoría de las mujeres son colonizadas por un tipo de levadura que se mantiene estable, mientras que las mujeres promiscuas tienden a ser portadoras de una mayor variedad de tipos (119). Sin embargo todavía no se ha podido aclarar que diferencias epidemiológicas marcan la infección vaginal recurrente por Candida de las que no son recurrentes. Tanto unos aislamientos como otros suelen ser iguales a los biotipos encontrados en las heces de las mujeres con vaginitis por Candida. En unos casos se indica un 56,3% y en otros un 85,7% de pacientes con candidosis recurrente causada por el mismo biotipo inicial. En un estudio realizado en una paciente que sufrió tres episodios de

infección vaginal por Candida, el estudio del ADN de las tres cepas aisladas demostró que era la misma cepa la causante de las tres infecciones, mientras que el estudio de sus fenotipos reveló marcadas diferencias entre los tres aislamientos. Esto nos lleva a pensar que estas diferencias entre cepas pueda ser debido más a un mecanismo de variación fenotípica más que a diferencias genotípicas (119,191,203,223,278,279,280).

Una nueva forma de estudiar la epidemiología de las infecciones por Candida se basaron en la teoría del polimorfismo adaptativo (116). Esta teoría predice que las especies que ocupan un amplio nicho ecológico serán fenotípicamente y genotípicamente más variables que aquellas que ocupan nichos más estrechos. Se hizo un estudio de reacciones de asimilación y perfil enzimático y los autores encontraron que C. glabrata y C. albicans que son comensales obligados, eran menos variables que C. neoformans que era un patógeno ambiental (116,119).

6. VARIACION EN LA VIRULENCIA ENTRE CEPAS

La variación en la virulencia entre cepas bacterianas de la misma especie es bien conocida. Esto ha sido demostrado, por ejemplo, en la diferente habilidad para causar meningitis existente entre diferentes serotipos de Escherichia coli y en Haemophilus influenzae. Algunas veces la diferente habilidad para causar enfermedad parece ser debida a diferencias en la producción de toxinas como ocurre en E. coli, Corynebacterium diphteriae, o Staphylococcus aureus. También se han demostrado variaciones en la virulencia asociados a una morfología colonial característica como ocurre en Neisseria gonorrhoeae y Bordetella pertussis (243). C. albicans puede dividirse en un número de biotipos, muy importantes en estudios epidemiológicos de brotes de infecciones en áreas restringidas o resultados de una infección. Ciertos biotipos pueden ser más virulentos que otros y extenderse en unidades hospitalarias de igual modo que determinados tipos de Staphylococcus o de Pseudomonas (26,29,41,42,114,166,167,201,221,243,264).

Se han hecho algunos estudios de variaciones en la virulencia de C. albicans, pero la mayoría han probado un número de cepas muy reducido en animales de experimentación. Además algunas de las cepas comparadas en estos estudios eran mutantes obtenidos en el laboratorio o al menos atípicas. Por eso el significado clínico de estos trabajos es incierto. Hasenclever y Mitchell en 1961 hicieron un estudio de virulencia con un gran número de cepas que no mostraron diferencias entre los serotipos A y B de virulencia en ratones, y sólo diferencias menores con C. albicans var stellatoidea. Sin embargo, Sandula, Krockova-Kratochvilova y Zamecnikova en 1963 (119), encontraron variaciones en la virulencia de 95

cepas inoculadas en ratones que se correlacionaba con la micro-morfología. Las cepas más virulentas mostraba racimos de blastosporas pequeñas esféricas sobre el pseudomicelio, mientras que las menos virulentas las tenían grandes y elongadas.

Ha habido muy pocos intentos de estudiar la variaciones de cepas y la virulencia para caracterización de cepas en individuos con y sin infección por Candida. Martin y Lamb (161) mostraron que 29 de 30 pacientes con estomatitis inducida por dentadura estaban infectados por cepas de serotipo A mientras el grupo control tendía a mostrar una mezcla de serotipos A y B. Cassone y cols. (44) aislaron en mujeres con candidosis vulvovaginal cepas de C. albicans que mostraron mayor secreción de proteínasa extracelular que las cepas aisladas de portadoras sanas. Por otro lado, Odds y cols. (195) realizaron un estudio comparativo de cepas aisladas de zonas superficiales y profundas para diferenciar tipos asociados a invasividad, y no encontraron diferencias significativas en la distribución de fenotipos. Hunter y Fraser (112), utilizando un método de resistotipado también trataron de encontrar tipos asociados con invasividad. Para ello estudiaron cepas procedentes de vagina y heces y no encontraron diferencias con los controles.

Sin embargo dichos autores (114), en un estudio retrospectivo posterior sí observaron diferencias morfológicas entre los aislamientos procedentes de lugares superficiales o profundos. Estudiaron 446 cepas de C. albicans y vieron que un 20% de las infecciones profundas eran causadas por cepas con borde discontinuo comparado con sólo el 4,36% de las de los lugares superficiales. Además, de 12 infecciones fatales estudiadas, el 67% tenían borde discontinuo comparado con el 11% del resto de las infecciones profundas, lo cual sugería que un paciente con una infección profunda causada por Candida de un tipo con borde discontinuo, tenían una probabilidad de desenlace fatal del 80% frente a otros pacientes con la misma infección causada por otro tipo de cepa. Esta asociación entre morfotipos de borde discontinuo e infecciones invasivas de mal pronóstico fue corroborado en un estudio posterior (113). Sin embargo no quedaba claro si estas diferencias eran debidas a un grupo filogenéticamente más virulento o era debido a una selección de un grupo filogenético más virulento o a la selección de un variante fenotípico más virulento. Hace poco se observó que diferentes variantes fenotípicos de las misma cepa podían exhibir distinta virulencia (61,278,279). Así pues, de los pocos estudios de variaciones en la morfología y la virulencia, en cepas de infecciones humanas los hallazgos han sido equívocos. Esto puede ser porque la mayoría de las cepas de C. albicans tengan la misma virulencia, pero también puede ser debido a que los métodos utilizados no fueran suficientemente discriminativos para diferenciar las especies con más virulencia. Hasta hace poco había pocos métodos de tipado para la diferenciación de cepas de C. albicans.

7. CARACTERIZACION DE LEVADURAS DE INTERES CLINICO

Durante la década de los 80 se han ido describiendo numerosos métodos de tipado para la diferenciación de cepas de C. albicans, sin embargo todavía ninguno es el ideal ya que no es posible tipar C. albicans más allá del nivel de especie con cierto grado de certeza. La falta de un esquema de tipado adecuado indudablemente interfiere la investigación de la epidemiología de las micosis y la virulencia de las levaduras patógenas. Esto no quiere decir que no haya métodos de tipado que permitan distinguir distintos biotipos, sino que quizás se han descrito muchos últimamente y no se ha aceptado ninguno como referencia. Antes de describir los métodos de tipado de que disponemos es importante distinguir claramente un esquema de tipado de un método de tipado y saber qué características definen un buen esquema de tipado. Un **método de tipado** sólo es capaz de diferenciar entre dos cepas no relacionadas. Un **esquema de tipado** es capaz de distinguir una cepa de tal modo que cuando se comparen los resultados de tipado entre diferentes centros puedan asegurar con un alto grado de certeza que los aislamientos comparados son similares o diferentes unos de otros. Cuando se evalúa un esquema o método de tipado, hay 3 características fundamentales que se deben considerar: la tipabilidad, la reproducibilidad y el poder de discriminación. Además de éstas hay otras características secundarias como el coste, la sencillez del método y el tiempo que se tarda en obtener los resultados, que también deben ser considerados (119).

La **tipabilidad** de un método es la proporción de una población de aislamientos que pueden ser tipados con un método. Todos los métodos existentes de tipado de C. albicans tienen 100% de tipabilidad, menos el método de agar Sabouraud-Trifeniltetrazolio. (236). La **reproducibilidad** de un método de tipado incluye 3 conceptos, la reproducibilidad "in vivo" e "in vitro" y la reproducibilidad entre centros. La reproducibilidad "in vitro" es la proporción de cepas que dan el mismo biotipo cuando se repite la prueba después de varios meses. Si de 100 cepas tipadas en dos ocasiones distintas, 5 de ellas fueran diferentes del resultado original la reproducibilidad "in vitro" sería del 95%. La reproducibilidad "in vivo" es un concepto bastante más complejo que refleja si la población de una cepa determinada es estable en su hospedador (119). Los estudios de reproducibilidad "in vivo" generalmente requieren repetir el examen de los biotipos de pacientes voluntarios a lo largo de un período de tiempo. La reproducibilidad "in vitro" refleja si un método de tipado es digno de confianza, mientras que la reproducibilidad "in vivo" refleja la estabilidad del microorganismo que se está estudiando. Una reproducibilidad baja "in vivo" puede ser debido a una colonización por diferentes cepas o a la inestabilidad fenotípica de una cepa residente. Este último concepto de inestabilidad fenotípica es un problema potencial serio en C. albicans y se discutirá más tarde.

Los estudios de reproducibilidad entre centros hasta ahora han sido escasos y dudosos, ya que mientras no se esté seguro de que los resultados de un centro y otro son idénticos no se puede asumir que los resultados experimentales de un centro pueden repetirse exactamente en otro. La **discriminación** de un método es una estimación de su habilidad para diferenciar entre dos cepas no relacionadas (119). Hasta hace poco esta denominación se describía en términos de número de tipos discriminados y la frecuencia del tipo más común, con lo cual los resultados obtenidos en algunos casos no eran nada satisfactorios. En teoría un método es más discriminatorio cuanto más diversidad encuentra y aplicando esta fórmula no siempre era así. El problema estaba en definir de forma más acertada qué era el poder discriminatorio (113). El objetivo de base del tipado de patógenos microbianos es distinguir entre cepas no relacionadas. Hunter y Gaston (113) sugirieron que el poder discriminatorio podía ser definido matemáticamente como la probabilidad de que dos cepas, elegidas al azar en la población de cepas no relacionadas, fueran distinguidas con un método de tipado. Esta definición ha sido aceptada y con ella se aceptó el índice numérico del poder discriminatorio (D), cuya probabilidad la da la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1 \sum X_j (X_j - 1)}{N (N - 1)}$$

donde "s" es el número de tipos, "X_j" es el número de población que muestra el tipo j, y "N" es el tamaño de la población. Esta ecuación es idéntica al índice de diversidad de Simpson y sólo es aplicable a situaciones donde todas las cepas se distribuyan en grupos mutuamente excluyentes. Para solucionar esta limitación la fórmula se generalizó quedando de este modo:

$$D = 1 - \frac{1 \sum a_j}{N(N-1)}$$

donde "a_j" es el número de cepas de la población que son indistinguibles de la cepa j, y "N" el número de cepas en la población. Estos dos índices son también la base de los nuevos procedimientos de selección cuando se desarrollan nuevos métodos de tipado.

Los factores secundarios de coste, sencillez de uso y tiempo de realización son relativamente fáciles de entender. Sin embargo otros factores adicionales como la demora y el coste de envío se deben considerar para métodos que normalmente se hacen en un centro de referencia.

8. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS

Las reacciones de seroaglutinación fueron las que primero se aplicaron a C. albicans, entonces conocida como Monilia albicans en 1931. Aunque Benham (119,243) examinó pocas cepas, encontró reacciones cruzadas entre todas las cepas de M. albicans y entre cepas de M. albicans y otras especies de Monilia. Sin embargo, todas las cepas de M. albicans absorbían la actividad aglutinante de los sueros frente a otras cepas de la misma especie. Sin embargo, hasta 1961 no se describieron las diferencias serológicas entre cepas de C. albicans. Al fin se consiguió un suero que no perdía su actividad aglutinante para las cepas inmunizantes después de ser absorbido por otra cepa de C. albicans. Este suero mostró una capacidad aglutinante diferencial entre las otras cepas. Aquellas cepas que eran aglutinadas por el antisuero se denominaron "grupo A" y las que no "grupo B" ($D = 0,505$). Posteriormente se observó que las cepas del "grupo A" podían absorber completamente la actividad aglutinante de los sueros frente al "grupo B", pero no ocurría lo contrario. Esto sugería, que las cepas del "grupo A" poseían tanto antígenos comunes como específicos, mientras que el "grupo B" poseía sólo antígenos comunes. Esto fue confirmado en 1980 por Guinet y Gabriel (119). Además de estos dos grupos existe un grupo menor denominado "C", que fue determinado por Muller y Kirchoff en 1969 (243).

A pesar de la simplicidad de este método basado en reacciones de aglutinación en porta, la presencia de sólo dos serogrupos mayoritarios ha limitado la utilidad del serotipado para C. albicans. Además el "grupo A" se aísla con una gran frecuencia, oscilando en diferentes estudios entre el 68-90% de los aislamientos, con lo que el poder discriminatorio es muy bajo ($D = 0,438-0,186$). Es interesante mencionar que la resistencia a 5FC casi siempre se ha encontrado asociada con cepas del "grupo B" (119). Más recientemente, Brawner y Cutler (19) realizaron un estudio de serotipado en C. albicans usando el anticuerpo monoclonal H9 y fueron capaces de separar 128 aislamientos en 74 que eran débilmente reactivos y 54 que eran fuertemente reactivos ($D = 0,492$).

El método de tipado basado en las variaciones de la morfología colonial de C. albicans fue enunciado por primera vez en 1935 por Negroni (189), que describió una variante rugosa que no era patógena para los conejos. Brown-Thomsen en 1968 (20) caracterizó 15 formas morfológicas de C. albicans y dos formas morfológicas diferentes en C. tropicalis, después de sembrarlas en extracto de malta e incubarlas a 25°C durante 10 días. Casi todos los aislamientos frescos pertenecían al tipo A1 con colonias de características lisas. Después de ser conservadas algún tiempo desarrollaban características que las situaban dentro de otros tipos. Estos cambios en las características superficiales también los observaron otros autores y se calcula que ocurre con una frecuencia de 1.4×10^{-4} (61,281).

Las observaciones de Brown-Thomsen fueron desarrolladas por Phongpaichit, Mackenzie y Fraser en 1987 (221), creando un método de tipado denominado "morfotipado". Este método permitía distinguir más tipos dando códigos a distintas características coloniales de forma que un código definía las características primarias, un segundo código describía las características secundarias y un tercer código ocasional definía otras características. Las características primarias describían el borde de la colonia (distribución, anchura y textura) y las características secundarias describían la superficie de la colonia (topografía, calidad, profundidad y abundancia). El dígito ocasional entre paréntesis describía características, como la presencia de pilosidades o vellosidades sobre la colonia o sobre el margen de esta. La reproducibilidad del método fue del 84% a lo largo de 2,5 años y del 96% para los que diferían en uno o menos caracteres adyacentes. No parecía que fuera afectado por la posibilidad de cambios fenotípicos, quizá debido a que la parte más importante a valorar era el borde de la colonia y no mostraba ser afectado por las variaciones fenotípicas. Sin embargo sí se observó que la morfología colonial era sensible a cambios producidos en la preparación del agar malta, como el sobrecalentamiento durante su elaboración que eliminaba la formación del borde de la colonia.

En un estudio posterior (114), el método de morfotipado pudo diferenciar 50 tipos en una población de 446 cepas, representando la más frecuente un 22% de las cepas ($D=0,905$) con una reproducibilidad del 84%. Si la reproducibilidad se aumenta al 96% como se explicó anteriormente la discriminación pasaba a ser $D=0,824$. El problema con este sistema de codificación era que la gran diversidad de tipos posibles dificultaba la comparación entre las poblaciones. Esto llevó a reagrupar los códigos en 6 grados: no producción de borde, borde discontinuo, borde continuo ancho y fino, borde continuo estrecho y fino, borde continuo ancho y grosero y borde continuo estrecho y grosero. Utilizando este nuevo método simplificado, la reproducibilidad resultó del 89% y el poder de discriminación resultó en una $D=0,615$ (114). La principal ventaja del morfotipado es que requiere un equipo poco costoso y permite su uso en laboratorios donde otros métodos resultan imposibles.

Incluidos en la categoría de métodos de biotipado están aquellos basados en la asimilación de fuentes de carbono y la detección de enzimas constitutivas extracelulares (119). Las variaciones en las reacciones de asimilación ya fueron observadas en 1968 cuando Brown-Thomsen describió 6 tipos auxanográficos diferentes en *C. albicans* atendiendo a variaciones en la asimilación de 4 fuentes de carbono: melezitosa, arabinosa, adonitol y ácido cítrico. El tipo más común tenía una frecuencia del 68% ($D=0,490$) y no se realizaron estudios de reproducibilidad. Posteriormente Syverson (284) realizó estudios de asimilación de 11 azúcares en 215 cepas y a pesar de que otros autores habían encontrado variaciones en la asimilación de todos ellos, él solo encontró variabilidad en 5 de estos azúcares. Además

observó que los cambios en las condiciones de las pruebas modificaban los resultados obtenidos. Usando un método comercial de asimilación de azúcares, el API 20C AUX, McCreight y cols en 1982 (167) detectaron 4 perfiles diferentes en 17 cepas de C. albicans. En estos métodos no se probó la reproducibilidad. Williamson y cols (307) estudiaron 130 aislamientos de C. albicans aplicando el método API 20C y encontró 13 biotipos en base a variaciones en la asimilación de 11 compuestos. La reproducibilidad resultó del 97%, sin embargo un 75% de las cepas se agrupaban en un mismo biotipo ($D=0,431$). Hunter y Fraser (115) usaron 64 fuentes carbonadas combinando el API 50CH y el ATB 32GN y observaron variaciones en 31 de las fuentes carbonadas. Aunque el poder discriminatorio para tantos azúcares fue muy alto, la reproducibilidad era muy baja y el poder discriminatorio estandarizado resultó del 0,155. Parece ser que los métodos de tipado basados en reacciones de asimilación de azúcares no dan buenos resultados debido a una baja discriminación o a una baja reproducibilidad. Aunque la discriminación se puede aumentar incorporando más número de compuestos carbonados a la prueba, sólo se consigue disminuir la reproducibilidad.

El método comercial API ZYM permite un análisis rápido del perfil enzimático de las levaduras basado en 19 enzimas constitutivas. Casal y Linares (39,40) encontraron 4 biovariedades que denominaron de la "A" a la "D" por variaciones en 4 enzimas: valina arilamidasa, cistina arilamidasa, α -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. La reproducibilidad fue del 100% pero la discriminación fue baja ($D=0,549$), ya que el biotipo mayoritario representaba el 64% de las cepas. Posteriormente se describió variabilidad en otra enzima, la β -glucosidasa (42). Otros autores encontraron peor discriminación $D=0,471$ y reproducibilidad del 100%, $D=0,487$ y reproducibilidad del 97% y $D=0,308$ y reproducibilidad del 93% (16,119,308). Esta variación en el perfil enzimático se ha observado también en otras levaduras de importancia médica (16,41,306). Este mismo método lo han ensayado en 1986 Williamson y cols. (307) con C. albicans y con C. tropicalis, obteniendo muy buena reproducibilidad (100%) pero pobre discriminación ($D=0,549$). El biotipado mediante API ZYM es sencillo y rápido ya que sólo tarda 4 horas, pero a pesar de su buena reproducibilidad, el bajo poder de discriminación limita su potencial.

Odds y Abbott en 1980 (193) describieron un método basado en 10 reacciones bioquímicas. En 1983 aumentaron el número de pruebas a 14 y en 1989 volvieron a reducirlo de nuevo a 10 (194). Las últimas diez pruebas estaban basadas en la capacidad de las levaduras para crecer un medio a pH 1,4 y pH 1,55, la capacidad de crecer en presencia de 5-fluorocitosina, sal, borato y safranina, y la habilidad para asimilar urea, sorbosa y citrato, junto con la producción de proteínasa extracelular. Anteriormente había incluido otras pruebas como el crecimiento en agar MacConkey y la reducción de cloruro de tetrazolio. La D95 del método original fue de 0,657. Se han diferenciado 44 tipos y el más frecuente representó un

14%. No mencionan la reproducibilidad del método, aunque no parece que haya buena reproducibilidad entre los datos de distintos centros. Odds ha mencionado que este método no es adecuado para su utilización en rutina y que debe emplearse como método para fines de investigación. A pesar de ello este método ha sido ampliamente utilizado durante los últimos años y ha contribuido a un mejor conocimiento de la epidemiología de las infecciones por Candida.

Otro método de tipar levaduras es el resistotipado, que fue descrito por primera vez en 1979 por Warnock y cols. (301). Este método se basa en la habilidad de las distintas cepas de crecer en medios sólidos que contienen concentraciones conocidas de varios inhibidores químicos. En el método original se utilizaban 6 diluciones de cada inhibidor (verde malaquita, ácido bórico, arsenato sódico, sulfato cúprico, acrilamida y 4-clororesorcinol). Las soluciones "madre" de los inhibidores se añadían a las placas dando 6 diluciones por inhibidor, y los aislamientos se inoculaban sobre las placas con un replicador que permitía inocular 25 cepas por placa. La sensibilidad o resistencia de cada placa se determinaba en relación a unas cepas control bien conocidas. Sin embargo existían problemas en la reproducibilidad, que los autores consideraban debidos a variaciones en la densidad del inóculo. No se pudo determinar la discriminación del método porque no se estudió suficiente número de cepas. En 1982 el método de resistotipado fue modificado por McCreight y Warnock (167) reduciéndolo sólo a 5 inhibidores (selenito sódico, ácido bórico, cetrimida, periodato sódico y nitrato de plata). El número de diluciones por inhibidor también se redujo a cuatro. Se encontraron 16 tipos diferentes, el más frecuente de los cuales representó un 25% de la población. El poder de discriminación fue aceptable ($D=0,882$) y los autores indicaban una reproducibilidad "in vitro" del 96% y una buena reproducibilidad "in vivo". Este método fue posteriormente modificado por Medcraft en 1983 (119), que añadió dos inhibidores, verde malaquita y sulfato cúprico. Hunter y Fraser en 1987 encuentran poca reproducibilidad con este método, especialmente con el nitrato de plata que decidieron eliminar (112). Estos autores usaron unas pruebas de resistotipado compuestas por selenito, ácido bórico, cetrimida, verde malachita, sulfato cúprico, cloruro de benzalconio, clorhexidina, mercurocromo, arsenado, 5-fluorocitosina, sal y agar MacConkey. En vez de utilizar muchas diluciones ellos lo ajustaron en dos diluciones. Las cepas eran resistentes a un inhibidor si crecían en ambas diluciones, sensible si no crecían en ninguna, e intermedias si crecían en sólo una concentración. La reproducibilidad "in vitro" y el poder discriminatorio varió dependiendo del número de diferencias requeridas para distinguir entre cepas ($D_{95}=0,564$) y la reproducibilidad "in vivo" fue buena. El resistotipado parece ofrecer una buena discriminación y reproducibilidad como método de tipado para C. albicans. Sin embargo, requiere una meticulosa atención en la preparación de los medios y los inóculos, que si no se tiene en cuenta altera enormemente la reproducibilidad y no es un método adecuado para aquellos laboratorios que tipen levaduras de forma ocasional.

Otro método también utilizado en tipado de levaduras fue el método de levaduras inhibidoras, que fue descrito por primera vez en 1983 por Polonelli y cols. (225). Se basaba en la capacidad que poseían 9 levaduras para inhibir selectivamente el crecimiento de diferentes cepas de C. albicans. Estas levaduras inhibidoras incluían 8 Hansenula sp. y una Pichia sp. El método original era capaz de diferenciar 25 tipos diferentes aunque el tipo más frecuentemente encontrado representaba el 52% de la población (D=0,714) y los autores no mencionan la reproducibilidad. Utilizando estas levaduras con capacidad inhibidora pudieron tipar cepas de C. neoformans, C. glabrata, C. kefyr y C. tropicalis. Caprilli (37) y cols también utilizaron estas 9 levaduras inhibidoras y descubrieron peor poder de discriminación ya que sólo encontraron 7 biotipos, representando uno de ellos el 78% de la población. Esta discrepancia fue probablemente debida a las poblaciones de C. albicans empleadas para valorar el método. Caprilli utilizó sólo aislamientos clínicos mientras que Polonelli utilizó una mezcla de aislamientos de origen humano y animal. Posteriormente Caprilli y cols. aumentaron el número de levaduras inhibidoras a 21. En un estudio de 100 aislamientos de C. albicans procedentes de fuentes humanas, fueron capaces de encontrar 27 tipos diferentes, representando el biotipo más frecuente del 48% de la población (D=0,756). Estos autores encontraron un 99% de reproducibilidad, pero hicieron las pruebas de retipado sólo 10 días después.

Lehmann y cols (146) mejoraron aún más la discriminación del método utilizando 30 cepas inhibidoras. Describieron 19 tipos, de los cuales el más común representó un 21% de las cepas (D=0,899); en aquel momento no indicaron la reproducibilidad, aunque en un artículo posterior comentaron que la reproducibilidad después de varios meses no fue buena. La reproducibilidad puede ser un problema debido en parte a la pérdida de actividad de las cepas inhibidoras (119). Hacen falta más estudios para conocer la reproducibilidad y la utilidad de las levaduras inhibidoras como método de tipado. Una alternativa de este método consistió en utilizar toxinas de estas levaduras inhibidoras parcialmente purificadas, de forma que se depositaba directamente sobre la placa a estudiar, una gota del sobrenadante de la fracción purificada. La zona de inhibición se recodificó y observaron que se mejoraba la discriminación, aunque no dieron suficientes datos que permitieran su cálculo; encontraron una reproducibilidad del 95% (119).

También se ha recurrido a utilizar métodos combinados para el tipado de levaduras. El primer brote de infecciones por Candida que fue caracterizado, se realizó usando tres métodos de tipado, morfotipado, biotipado y serotipado; posteriormente se han hecho muy pocos estudios que valoren si combinando varios métodos se consigue mejorar la discriminación. El primero de estos intentos lo realizó Caprilli combinando las levaduras inhibidoras con un resistotipado reducido que empleaba 5-flucitosina, sulfato cúprico y arsenado sódico. Sólo con las 30 levaduras inhibidoras encontraban 19 tipos (D=0,899),

cuando añadieron el resistotipado pudieron distinguir 33, representando el más frecuente el 1,5% ($D=0,961$). Sin embargo, la reproducibilidad al cabo de 6 meses continuó siendo muy baja. En un estudio posterior se combinaron las reacciones de asimilación del API 20C, que detectaba 13 grupos de los cuales el mayoritario representó el 75% ($D=0,431$), con la producción de enzimas extracelulares usando el API ZYM que detectaba 9 grupos de los cuales el más frecuente aparecía en el 70% ($D=0,487$) y con la resistencia a ácido bórico ($D=0,506$); todos ellos con una reproducibilidad del 97% (308). Hunter y Fraser (115) compararon la reproducibilidad y el poder discriminatorio de 4 métodos de tipado, solos y en combinación; encontraron que usando el resistotipado y el morfotipado se conseguía la mejor combinación de poder discriminatorio y reproducibilidad ($D_{95}=0,673$). Esta combinación además mostró una buena reproducibilidad "in vitro". Si se añadían las reacciones de asimilación de azúcares a esta combinación, la reproducibilidad disminuía ($D_{95}=0,655$) y cuando se añadía el API ZYM el poder de discriminación mejoraba ($D_{95}=0,716$), pero no les pareció suficiente razón para utilizar de forma rutinaria. A pesar de estos intentos, los cálculos de la reproducibilidad y la discriminación de posibles combinaciones es realmente complejo, porque por ejemplo, podría no ser posible colocar todas las cepas en grupos bien definidos y mutuamente excluyentes debido a la presencia de cepas intermedias.

Además de estos métodos se están ensayando gran variedad de métodos basados en el perfil electroforético tanto de proteínas como del DNA, estudios de isoenzimas, patrones de restricción de DNA, cariotipado y sondas de ácidos nucleicos. El polimorfismo electroforético de todas las proteínas celulares fue el primer intento al respecto realizado por Shechter y cols (119). En un estudio de 9 aislamientos de C. albicans incluida C. albicans var stellatoidea encontraron 3 tipos diferentes obtenidos por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA). Más recientemente Bruneau y Guinet (119) utilizando EGPA encontraron el mismo perfil de proteínas en 14 cepas de C. albicans recogidas de diferentes fuentes.

Las técnicas de transferencia han ofrecido mejores expectativas; Lee y cols (142) describieron un método usando suero policlonal hiperinmune de conejos. Hicieron un EGPA de un extracto proteico, y las proteínas y glicoproteínas separadas con esta técnica fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el suero de conejo y posteriormente los lugares de unión de los anticuerpos se visualizaron por varios métodos. El poder de discriminación de este método fue bajo ($D=0,633$), aunque se encontraron 16 tipos, los dos más frecuentes representaron el 80% de la población estudiada. No evaluaron la reproducibilidad pero sí observaron una variación de las posiciones relativas de los antígenos de unos geles a otros, lo cual planteaba un problema. También utilizando el método de transferencia, Polonelli y Morace (227) demostraron la unión de un anticuerpo

monoclonal a polipéptidos de varios pesos moleculares. Encontraron 5 tipos en 10 cepas de las C. albicans estudiadas. El mismo anticuerpo monoclonal daba patrones característicos para un amplio número de levaduras incluidas otras especies de Candida, C. neoformans y Malassezia. Tampoco indicaron la reproducibilidad.

Los métodos de tipado mediante isoenzimas se basan en la extracción de las proteínas intracelulares y su análisis por EGPA. Lehmann y cols (146) encontraron variaciones en 6 enzimas: α -glucosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenada y superóxido dismutasa. Analizaron 37 cepas de C. albicans y encontraron 4 patrones para la enzima α -glucosidasa, con un tipo mayoritario que representó el 84% (D=0,296), dos patrones en la fosfatasa alcalina (D=0,240), representando el más frecuente el 86% de la población. En la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa encontraron 3 tipos, con una frecuencia para el más común del 75% (D=0,419), en la malato deshidrogenasa también encontraron tres patrones de los cuales de mayoritario representó el 89% (D=0,204). En la isocitrato deshidrogenasa se encontraron dos tipos (D=0,511), y para la superóxido dismutasa detectaron 4 tipos, el más frecuente de los cuales representó el 68% (D=0,503). Cuando combinaron todas las enzimas encontraron 23 tipos de los cuales el más frecuente representó un 27% de las cepas (D=0,923) lo cual indica un buen poder de discriminación, sin embargo no se hicieron estudios de reproducibilidad.

También se han hecho algunos intentos basados en el polimorfismo de los fragmentos de restricción de los ácidos nucleicos. Scherer y Stevens (264) fueron los primeros en estudiar este método como marcador epidemiológico. En el estudio original hicieron una digestión con EcoRI y encontraron 10 tipos en 17 cepas de C. albicans, representando el más común el 35% de las cepas, dando un poder de discriminación aceptable (D=0,805), los autores obtienen el 100 de reproducibilidad, aunque no es un dato fiable dado que las 6 cepas las analizaron en el mismo gel y las variaciones de gel a gel son importantes. Para estar seguro que dos cepas son iguales, hay que correrlas juntas en el gel lo que hace muy difícil el estudio comparativo de un gran número de cepas. En un estudio posterior estos autores encontraron 29 tipos diferentes entre 91 cepas de C. albicans aunque un 41% dieron el mismo patrón (D=0,814) y comprobaron una buena reproducibilidad "in vivo". Smith y cols (274) también utilizaron el análisis de fragmentos de restricción para tipar C. albicans y lo encontraron de valor. Sin embargo Mathews y Burnie (166) encontraron un poder de discriminación mucho menor que otros autores (D=0,599). Además tanto Mathews como Stevens (283) estudiaron las mismas cepas, con el mismo método para estudiar la epidemiología de una infección, unos encontraron que las cinco cepas eran diferentes y los otros que eran las mismas las que habían producido la infección. La razón por la cual se obtuvieron diferentes resultados utilizando el mismo método no se ha aclarado.

El método de cariotipado ha utilizado la electroforesis en geles en campo ortogonal alterno (EGCOA) y la electroforesis en geles en campo de inversión (EGCI), técnicas que permiten la separación de fragmentos de DNA muy grandes. Magee y Magee (156) estudiaron el cariotipo electroforético mediante EGCOA de 4 cepas de C. albicans, pudiendo diferenciarlas basándose en el tamaño del cromosoma. Snell (275,276) utilizando el EGCI encontró 4 patrones diferentes entre las 5 C. albicans que analizó y en discordancia Lott (119) encontró que las 8 cepas que estudiaba eran idénticas. Mahrous (157) empleó una electroforesis en campo alterno transversal y también encontró variaciones entre cepas. Sin embargo todavía no se han conseguido suficientes datos para conocer el poder de discriminación y la reproducibilidad. Además los métodos de cariotipado tienen las desventajas de necesitar un equipo muy costoso para su realización y muchos días para observar resultados de un número muy limitado de cepas, sin tener en cuenta que el cariotipo puede verse alterado por variaciones de las cepas (119).

Se están haciendo intentos de tipar C. albicans utilizando sondas de ácidos nucleicos para mejorar la discriminación de los métodos de transferencia de electroforesis de fragmentos de restricción. Utilizando un DNA ribosómico marcado en una digestión con EcoRI, Magee y cols (155,156), encontraron 6 tipos diferentes entre 12 cepas estudiadas, representando el tipo mayoritario el 58% de las cepas. Mason y cols (162) utilizaron un fragmento de DNA que contenía el gen clonado de actina de C. albicans y no vieron diferencias en 6 cepas estudiadas. Soll y cols (278,279) usaron una secuencia de repetición no móvil para diferenciar entre las cepas de C. albicans de varios años observando diferencias entre especies. La sonda Ca3 ha demostrado un alto poder de discriminación ($D=0,986$) y parece tener una gran reproducibilidad después de numerosos subcultivos.

A pesar del número y la variedad de métodos de tipación de levaduras descrito en los últimos tiempos, no hay ninguno satisfactorio. Mientras que casi todos los métodos tienen el 100% de tipabilidad, muchos tienen muy poca discriminación comparado con los métodos de tipación de bacterias. Además aquellos que tienen mejor discriminación tienden a tener peor reproducibilidad. Dicha reproducibilidad puede ser muy baja debido a los mecanismos de variaciones fenotípicas que presentan las levaduras. De todas las técnicas analizadas quizá los métodos biológicos, resistotipado, morfotipado y el biotipado de Odds y Abbott son probablemente los métodos de elección (119). Los métodos de tipado electroforético son muy caros y requieren un esfuerzo intenso. Sin embargo, estarían justificados si tuvieran más discriminación y reproducibilidad que los demás métodos. Hasta el momento no hay suficiente experiencia que así lo indique, aunque sí parecen mostrar poca discriminación; no obstante la reproducibilidad de la transferencia no se ha estudiado todavía. El uso de varias enzimas de digestión mejoraría la discriminación pero el coste sería prohibitivo para el uso rutinario. Hasta ahora ha habido pocos intentos de combinar varios métodos de tipado para conseguir

más discriminación.

9. EL PROBLEMA DE LAS VARIACIONES EN C. albicans

La capacidad de C. albicans para producir cambios fisiológicos en determinadas circunstancias ya fue descrito por Negroni (189) en 1935, al observar variaciones liso-rugoso. Posteriormente Brown-Thomsen (119) mostró que las variaciones coloniales eran bastante frecuentes después de ser guardadas durante 4 meses. Syverson (284) observó que en algunos casos el patrón de asimilación de azúcares entre las cepas no era una característica estable. Sin embargo el fenómeno de las variaciones en la morfología colonial no se investigó con detalle hasta 1985 en que Slutsky y cols (273) demostraron que C. albicans era capaz de pasar de uno a siete fenotipos distintos con una frecuencia de $1,4 \times 10^{-4}$. En un segundo estudio se describió la transición blanco-opaco que era acompañada por cambios en la fisiología celular (273a). Estas variaciones fenotípicas pueden tener un efecto importante en los métodos de biotipado. Este fenómeno es probablemente la causa de la baja reproducibilidad de los métodos de tipado basados en las reacciones de asimilación de azúcares. El morfotipado puede también verse afectado ya que este fenómeno se observó precisamente por variaciones de la morfología colonial y lo mismo ocurriría con el método de Odds (203,279).

Los métodos de transferencia también pueden verse afectados, ya que como consecuencia de las variaciones fenotípicas pueden producirse variaciones en la expresión de los antígenos de superficie. Incluso el cariotipo puede verse alterado porque sucedan cambios en el cromosoma durante el cambio de fenotipo. Estos cambios en el cariotipo se ha estimado que tienen unas frecuencias tan altas como del 1,4% (251). De esto queda claro que para que un método de tipado tenga aceptación tienen que hacerse estudios de reproducibilidad muy rigurosos tanto "in vivo" como "in vitro", que hasta ahora no se han hecho de forma adecuada.

II. OBJETIVOS

Las infecciones por hongos han adquirido un enorme protagonismo en estos últimos años y han llegado a constituir un problema importante. Esto viene a ser reflejo del progreso y de las nuevas esperanzas de vida en pacientes inmunocomprometidos o en aquellos sometidos a técnicas invasivas. Así mismo, el aumento de población inmunocomprometida ha hecho que aumente el espectro de levaduras diferentes a las clásicamente descritas como patógenas, y por consiguiente el laboratorio de Microbiología Clínica se encuentra en la necesidad de desarrollar métodos que identifiquen estos microorganismos de la forma más rápida y más eficaz posible. Por otro lado, el aumento de las infecciones debidas a estos microorganismos ha ido acompañado de la aparición de resistencias a los antifúngicos más utilizados en clínica y consecuentemente a la aparición de nuevos antifúngicos, tanto para el tratamiento de las infecciones superficiales como sistémicas.

La posibilidad de encontrar un método que diferencie distintos tipos en los hongos aislados de pacientes con micosis y que permita discriminar una colonización de una invasión sería una herramienta poderosa para investigar la epidemiología de las infecciones fúngicas y su prevención. Se han descrito diferentes métodos de tipación como el biotipado (193), perfil enzimático (40), morfotipado (221), serotipado (93), resistotipado (301), tipado mediante levaduras "killer" (225), perfil isoenzimático (146) y cariotipado (156) en un intento de detectar la posible correlación de algunos tipos de C. albicans con la virulencia de los aislamientos (119). Sin embargo todavía no es posible tipar C. albicans con cierto grado de certeza y la falta de un método apropiado de tipado indudablemente limita la investigación de la epidemiología de las candidosis y la virulencia de esta levadura patógena. Estos métodos generalmente no han sido aplicados a otras especies de levaduras y la mayoría de ellos implica una metodología relativamente complicada.

El objetivo principal de esta tesis ha sido evaluar la incidencia de levaduras de interés clínico en nuestro hospital, y estudiar posteriormente la utilidad epidemiológica de algunos métodos de biotipado, aún muy poco desarrollados en Micología Médica.

Para alcanzar este objetivo primordial se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Analizar la incidencia de especies de levaduras en el Hospital Universitario San Carlos.
- 2.- Analizar la susceptibilidad de las levaduras aisladas para conocer las resistencias existentes entre nuestros aislamientos.
- 3.- Estudiar de forma exhaustiva los diferentes métodos de tipado existentes o

desarrollados por nosotros para conocer su capacidad de discriminación, reproducibilidad, tipabilidad y operatividad.

- 4.- Estudiar la correlación entre los distintos métodos de tipado estudiados para una posible combinación de éstos.
- 5.- Valorar qué métodos podrían tener más interés para su utilización en el Laboratorio de Microbiología Clínica.
- 6.- Encontrar una clave fenotípica que permitiera diferenciar la colonización de la invasión y por tanto se correlacionara con la virulencia de cada biotipo.

III. MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS ESTUDIADAS

Se estudiaron 435 aislamientos clínicos de levaduras recogidas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Carlos durante parte de los años 1989 y 1990. Las muestras de donde se aislaron los microorganismos objeto de este estudio aparecen reflejados en la Tabla 1. Dentro de las muestras con carácter invasivo se incluyeron: sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, biopsias y aspirados bronquiales. En las muestras de piel se incluyeron los raspados de piel y uñas, escamas, exudados de heridas y furúnculos (114). Dentro de las muestras de tubo digestivo se incluyeron los exudados orales y linguales, exudados faríngeos, tracto gastrointestinal y heces.

Como controles de sensibilidad en la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias a los antifúngicos estudiados, en las pruebas bioquímicas de identificación de especies y en cada uno de los métodos de tipado estudiados, se incluyeron los siguientes microorganismos: C. albicans ATCC 10231, C. laurentii ATCC 18803, C. kefyr ATCC 28838 y CPJR (C. pelliculosa) de nuestro cepario procedente de una onicomiosis diagnosticada por el Dr. Juan Ramón Maestre. También se emplearon las cepas Rc6, Rc7, Rc8, Rc9, Rc10 y 12C todas ellas cedidas por Dr. Graham White de la Unidad de Tipado de Candida del Public Health Laboratory Service de Londres.

Para la conservación definitiva de las cepas de la colección se emplearon el método de congelación a -70°C de un cultivo puro de levaduras de 24 h. en 1 ml de leche descremada en tubos pequeños con tapón de rosca y el método de liofilizado en vacío de una suspensión celular en leche descremada congelada a -30°C . Ambos conservan las levaduras durante años. Para el mantenimiento de las cepas de trabajo se empleó la picadura en agar blando (1,15 g de agar nutritivo, 0,85 g de caldo nutritivo y 100 ml de agua destilada) y suspensiones celulares de cada una de las levaduras en agua destilada estéril contenidas en tubos de rosca. Ambos se conservaron a temperatura ambiente durante meses.

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

El examen microscópico directo de las muestras clínicas sospechosas de contener levaduras, se realizó añadiendo una gota de hidróxido potásico al 10% (la adicción de glicerol al 20% conservaba el montaje varios días), calentando la muestra suavemente cuando se trataba de escamas de piel y uñas.

La tinción de lactofenol azul de algodón (Merk) se empleó para teñir montajes fluidos. El ácido láctico (20 ml) aclaraba la preparación, el fenol (20 ml) destruía el hongo, el glicerol (40 ml) evitaba la desecación y el azul algodón (0,05 mg) da color a las estructuras, todos estos componentes agua destilada hasta 100 ml. La tinción de Gram teñía las levaduras de violeta.

La tinción con una gota de tinta china de dibujo (Pelikan 17 negra Gunther Wagner) se utilizó para la observación de las cápsulas de C. neoformans en líquido cefalorraquídeo.

El aislamiento primario de las levaduras se realizó en medios de agar glucosado de Sabouraud (Difco) y agar glucosa peptona (Oxoid), ambos con un pH aproximado de 5,6 a los que se añadía cuando era necesario 10 ml/l de cloranfenicol al 0,5% o actidiona al 5%. Las placas sembradas se incubaban a 37°C y al cabo de 24-48 h. aparecían una colonias pastosas o cremosas en su mayoría (199,243).

TECNICA DE PRODUCCION DE TUBO GERMINAL. Se utilizó para diferenciar C. albicans de otras especies de Candida. Para ello se preparaba una mezcla de suero, distribuido en pequeñas alícuotas de aproximadamente 0,5 ml en tubos pequeños donde se preparaba la emulsión de levadura problema y se incubaba a 37°C durante 2-3 horas. A cabo de este tiempo se observaba una gota de este suero al microscopio, si la levadura producía tubo germinativo se trataba de C. albicans, si no lo producía se realizaban otras pruebas hasta llegar a su identificación (199,243).

TECNICA DE PRODUCCION DE CLAMIDOSPORAS. Se empleó para la identificación de C. albicans. La levadura problema se sembraba en estría sobre el agar de "corn-meal" (Difco) con tween 80 al 10% (Difco) siguiendo la "técnica de Dalmau" (243), se cubría con un portaobjetos y se incubaba a 25°C durante 3-5 días manteniéndolo en oscuridad. Al cabo de este tiempo se observaba el montaje directamente al microscopio, si producía clamidosporas se trataba de C. albicans, si no las producía era otra levadura. Este método servía a su vez para estudiar la morfología microscópica de cada aislamiento buscando la presencia de hifas, pseudohifas, artrosporas y otras características útiles para la correcta identificación de los aislamientos.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA: API 20C AUX. Es un sistema comercial para la identificación de las levaduras más comúnmente aisladas en el laboratorio de Microbiología Clínica. Se preparaba una suspensión con una turbidez igual al 2 de la escala de McFarland en 2 ml de agua destilada estéril o NaCl 0,85%, se transferían 100 μ l de dicha suspensión a una ampolla de C Medium y se homogeneizaba sin formar burbujas. A continuación se abría la galería con los azúcares deshidratados y se llenaban las cúpulas con 150 μ l de la

suspensión contenida en C Medium. Entonces se cerraba la cámara de incubación y se incubaba en estufa a 30°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se leía observando el crecimiento o no de cada una de las cúpulas, tomando como control la primera cúpula que era el control negativo. Se anotaba el código obtenido y se buscaba la identificación en el Catálogo Analítico API 20C AUX y ocasionalmente en el disquette APILAB .

Los aislamientos que no pudieron ser identificados o presentaron problemas en la identificación con los métodos antes mencionados se estudiaron en el Mycological Reference Laboratory de Londres, con la colaboración del Dr. C. K. Campbel donde se llevaron a cabo estudios de asimilación de azúcares en agar y en caldo según Wickerham (7,132), utilizando los siguientes compuestos: adonitol, A-arabinosa, L-arabinosa, celobiosa, ácido cítrico, dulcitol, eritritol, etanol, galactosa, glucosa, glicerol, inositol, DL-ácido láctico, lactosa, maltosa, D-manitol, melezitosa, melibiosa, metanol, rafinosa, L-ramnosa, D-ribosa, ácido salicílico, D-sorbitol, L-sorbosa, ácido succínico, sucrosa, almidón soluble, trehalosa y D-xilosa.

También se realizaron pruebas de fermentación de azúcares y de asimilación de nitrógeno, prueba de producción de urea (310). Además para la identificación de C. neoformans se requirió la prueba de pigmentación en medio de agar con extracto de semillas de Guizotia abyssinica (49), reducción de nitratos (7) y la presencia de fenoloxidasa (125).

3. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS

Durante los años 80, se han descrito un gran número de métodos de tipado para diferenciar cepas de C. albicans. Aunque estos métodos se basaban en una amplia variedad de marcadores fisiológicos y genéticos, hasta ahora ninguno se ha considerado el ideal. En el presente estudio se describen las técnicas de algunos de estos métodos que nos parecieron interesantes por sus cualidades de sencillez, bajo coste de realización y buena reproducibilidad y discriminación. Algunas de dichas técnicas son modificaciones del método original y otras técnicas han sido desarrolladas en nuestro hospital con fines epidemiológicos.

3.1 METODO API 20C

Se utilizó el código obtenido en la galería API 20C AUX para tipar las levaduras atendiendo a la variabilidad con que asimilan determinados azúcares. Cada código fue considerado como un biotipo diferente.

PRINCIPIO. Es un sistema comercial constituido por 20 cúpulas que contienen los sustratos deshidratados que permiten efectuar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas eran inoculadas en un medio semisólido y las levaduras crecían únicamente cuando eran capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Las lecturas de estas reacciones se hicieron comparándolas con los controles de crecimiento negativo. El código de 7 dígitos se obtenía asignando un valor numérico de 1, 2, 4 a cada grupo de tres en tres azúcares contenidos en la galería y sumándolo para obtener cada uno de los 7 dígitos finales que definían cada biotipo.

AZUCARES ENSAYADOS : glucosa (GLU), glicerol (GLY), 2-keto-D-gluconato (2KG), L-arabinosa (ARA), D-xilosa (XYL), adonitol (ADO), xilitol (XLT), galactosa (GAL), inositol (INO), sorbitol (SOR), Ó-metil-D-glucósido (MDG), N-acetil-D-glucosamina (NAG), celobiosa (CEL), lactosa (LAC), maltosa (MAL), sacarosa (SAC), trehalosa (TRE), melezitosa (MLZ), rafinosa (RAF). Las galerías y las ampollas de inoculación se conservaron a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en cada envase.

COMPOSICION DEL MEDIO. MEDIO C: sulfato de amonio, 5 g; fosfato monopotásico, 0,31 g; fosfato dipotásico, 0,45 g; cloruro sódico, 0,1 g; cloruro cálcico, 0,05 g; sulfato de magnesio, 0,2 g; histidina, 0,005 g; triptófano, 0,02 g; metionina, 0,02 g; agar 0,5, g; solución de vitaminas, 1 ml; solución de oligoelementos, 10 ml; agua destilada hasta 1000 ml. El pH final: 6,5-6,7. Aunque este medio contiene agar, no necesita fusión previa y se pipetea como un medio líquido. Es aconsejable sacar las ampollas de la nevera y dejarlas a temperatura ambiente una hora antes de su utilización. No se deben agitar para evitar la formación de burbujas.

PREPARACION DE LA GALERIA. Se sacaba la cámara de incubación de la caja y se repartían unos 5 ml de agua destilada estéril en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda. Se escribía la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara, entonces se sacaba una galería de azúcares de su precinto hermético y se colocaba en la cámara de incubación.

INOCULO. A partir de un cultivo en agar glucosado de Sabouraud de 48 h, se preparaba una suspensión con una turbidez igual al 2 de la escala de McFarland en 2 ml de agua destilada estéril, a continuación se transferían 100 μ l de dicha suspensión a una ampolla de C Medium y se homogeneizaba sin formar burbujas.

INOCULACION DE LA GALERIA. Posteriormente se abría la galería con los azúcares deshidratados y se llenaban las cúpulas con 150 μ l de la suspensión contenida en C Medium. Se cerraba la cámara de incubación y se incubaba en estufa a 30°C durante 48 h.

o eventualmente 72 h.

LECTURA DE LA GALERIAS. Transcurrido el tiempo se leía observando el crecimiento o no de cada una de las cúpulas tomando como control la primera cúpula que era el control negativo. Se anotaba el código obtenido y cada número diferente se consideró un biotipo distinto.

3.2 PERFIL ENZIMATICO CON API ZYM

Es un método semicuantitativo diseñado para el estudio de actividades enzimáticas. Permite un estudio rápido y sistemático de 19 reacciones enzimáticas utilizando cantidades de muestra muy pequeñas. No ha sido desarrollado con vistas a obtener la precisión de una técnica espectrofotométrica o electroforética, sino principalmente para permitir la realización de determinaciones enzimáticas en una muestra compleja que no ha sido purificada previamente.

PRINCIPIO. La galería API ZYM se compone de 20 microcúpulas, el fondo de las cuales contiene un soporte especialmente diseñado para contener el sustrato enzimático y el tampón. Este soporte permite el contacto entre la enzima y el sustrato generalmente insoluble. Las galerías deben guardarse entre 2-8°C y vigilar el tiempo de caducidad.

REACTIVOS. El reactivo zym A esta compuesto por tri-hidroximetil-amino-metano, 250 g; ácido hidroclicórico (37%), 110 ml; lauril sulfato, 100 g; y agua destilada hasta 1000 ml. Es mejor mantenerlo a temperatura ambiente. En la nevera forma unos precipitados que no afectan a sus propiedades y que se disuelven fácilmente dejándolo un tiempo a temperatura ambiente o incubando a 60°C. El reactivo zym B esta compuesto por azul rápido BB, 3,5 g y 2-metoxietanol hasta 1000 ml, es sensible a la luz y se destruye. Su deterioro es fácilmente observable porque el color normalmente amarillo vira a color rosa. Este reactivo debe preservarse de la luz envolviéndolo en papel de aluminio y guardándolo en nevera.

PREPARACION DE LA MUESTRA. Se utilizaba un cultivo puro en agar de Sabouraud glucosado de 24 h. Se preparaba una suspensión de una turbidez entre 5-6 de McFarland en agua destilada estéril. Para obtener resultados reproducibles era importante que los microorganismos que se comparaban crecieran inicialmente en el mismo cultivo, el diluyente para preparar la suspensión fuera el mismo y con la misma densidad óptica. Esta técnica ensayaba enzimas constituyentes. Los enzimas inducidos pueden estudiarse si se añaden los correspondientes inductores al medio de cultivo. Como no había crecimiento

durante la realización de la prueba no hay que tomar precauciones especiales de esterilidad o incubación.

ENZIMAS ENSAYADAS: 1= CONTROL; 2= FOSFATASA ALCALINA; 3= ESTERASA C4; 4= ESTERASA LIPASA C8; 5= LIPASA C14; 6= LEUCINA ARILAMIDASA; 7= VALINA ARILAMIDASA; 8= CISTINA ARILAMIDASA; 9= TRIPSINA; 10= A-QUIMOTRIPSINA; 11= FOSFATASA ACIDA; 12= NAFTOL-AS-BI-FOSFOHIDROLASA; 13= A-GALACTOSIDASA; 14= B-GALACTOSIDASA; 15= B-GLUCURONIDASA; 16= A-GLUCOSIDASA; 17= B-GLUCOSIDASA; 18= N-ACETIL-B-GLUCOSAMINIDASA; 19= A-MANOSIDASA; 20= A-FUCOSIDASA.

PREPARACION DE LAS GALERIAS. Se sacaba una base de plástico y una tapadera de la caja y se apuntaba el número del microorganismo a estudiar. Se añadían 5 ml de agua destilada estéril con un dispensador de agua a la base, para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación y se colocaba una galería API ZYM sobre dicha base de incubación. Con una pipeta Pasteur de plástico estéril desechable, se inoculaban 2 gotas de muestra a cada cúpula de la galería (equivalente a 65 μ l). Entonces la galería ya inoculada se cerraba con la tapa de plástico y se incubaba durante 4 h a 37° C en la oscuridad.

LECTURA DE LA GALERIA. Transcurrido el tiempo de incubación se sacaban las galerías de la estufa y se añadía una gota de reactivo Zym A y otra de reactivo Zym B en cada una de las cúpulas. Se dejaba actuar y desarrollar color durante 5 minutos bajo una luz fuerte. Después de la exposición, las reacciones negativas permanecían sin colorear. A cada una de las reacciones positivas se les asignó un número que osciló entre 0-5 dependiendo de la intensidad de color desarrollado comparándolo con un patrón incluido en el "kit". El número de nanomoles aproximado se podía saber según el grado de coloración: 1 corresponde a una liberación de 5 nanomoles de enzima, 2 a 10 nm, 3 a 20 nm, 4 a 30 nm, 5 a 40 nm. Los colores permanecían estables durante varias horas después de que la galería había sido inoculada con los reactivos.

CODIGO DE TIPADO. Para la determinación del código de cada una de las cepas estudiadas se interpretaron cada una de las actividades estudiadas en término de positivo-negativo y a cada uno de los perfiles obtenidos de este modo, se les atribuyó un código de dos letras. La correspondencia de código con su perfil enzimático se indica en la Tabla 1.

TABLA 1. Perfiles enzimáticos encontrados en las levaduras estudiadas.

PERFIL	N° ENZIMAS																																
	2	3	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	16	17	18	PERFIL	N° ENZIMAS																
	2	3	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	16	17	18			2	3	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	16	17	18	
E1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	E31	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0		
E2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E32	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1		
E3	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	E33	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0		
E4	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	E34	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0		
E5	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	E35	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0		
E6	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	E36	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0		
E7	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	E37	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0		
E8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	E38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0		
E9	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	E39	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0		
E10	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	E40	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
E11	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	E41	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0		
E12	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	E42	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1		
E13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	E43	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1		
E14	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	E44	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
E15	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	E45	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1		
E16	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	E46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1		
E17	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	E47	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1		
E18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	E48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1		
E19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	E49	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0		
E20	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E50	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0		
E21	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	E51	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1		
E22	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E52	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1		
E23	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E53	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
E24	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E54	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1		
E25	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	E55	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1		
E26	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	E56	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0		
E27	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	E57	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0		
E28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	E58	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1		
E29	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	E59	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1		
E30	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1																		

3.3 RESISTOTIPADO

PRINCIPIO. El resistotipado se basa en la distinta capacidad que tienen los diferentes tipos de levaduras de crecer en presencia de determinadas concentraciones de compuestos químicos. Los compuestos químicos utilizados en este método fueron urea, citrato, 5-fluorocitosina, ácido bórico, cloruro sódico y agar de MacConkey.

PREPARACION DE LAS PLACAS. PLACAS CON UREA, CITRATO Y 5-FLUOROCITOSINA. El medio base empleado para la preparación de las placas de urea, citrato y 5-fluorocitosina fue el mismo para las tres pruebas y se siguió el método de Odds (193): agar fluido (Bacto-Agar) 22,2 g por cada litro de agua destilada; este medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,2 atmósferas y posteriormente se mantenía en baño con agitación a 55°C. Las placas conteniendo urea se preparaban con 1,34 g de Yeast Nitrogen Base (Difco), 4 g de urea (Difco 0190-15) y 20 ml de agua destilada. Este producto se esterilizaba por filtración usando filtro de 0,2 μm y entonces se

le añadían 180 ml de medio base, se agitaba suavemente hasta homogeneizar bien y se distribuían en placas de 20 ml. Las placas con citrato se preparaban a partir de una solución que contenía ácido cítrico al 4% (Probus) y citrato sódico (Panreac 131655) también al 4% hasta conseguir un pH 2,8. A 20 ml de esta solución se le añadían 1,34 g de Yeast Nitrogen Base (Difco) y todo ello se esterilizaba por filtración con filtro 0,2 μm añadiendo posteriormente 180 ml de medio base, agitando hasta mezclar bien los componentes y dispensando en placas de petri de 20 ml.

Las placas de 5-fluorocitosina se prepararon con 1,34 g de Yeast Nitrogen Base (Difco), 4 g de glucosa (Panreac Cod 131341), 5 mg de 5-flucitosina (Sigma F-7129) y 20 ml de agua destilada. Este producto se esterilizó por filtración con filtro de 0,2 μm y se le añadieron 180 ml de agar base, agitando suavemente hasta homogeneizar, distribuyéndolo finalmente en placas de 20 ml. Las placas de ácido bórico se prepararon siguiendo la técnica de Williamson (308). El medio base se preparó con 6,7 g de Yeast Nitrogen Base (Difco 0392-15-9), 1,5 g de L-asparagina (Sigma 0884), 10 g de glucosa (Panreac 131341), bacto agar (Difco 0140-01) y agua destilada hasta un litro. Este medio se esterilizaba en autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,2 atmósferas. Se enfriaba a 50°C y entonces se le añadían 1,8 mg/ml de ácido bórico (Panreac 131015), se agitaba suavemente el matraz hasta la perfecta disolución y se repartía en placas de 20 ml.

Las placas que contenían cloruro sódico se preparaban a partir de un medio base compuesto por 20 g de glucosa (Panreac 131341), 10 g de extracto de levadura (Difco), 20 g de Bacto agar (Difco) y agua destilada hasta un litro. Se preparaban tres matraces con este medio y a cada uno de ellos se le añadía el NaCl (Probus 172220) a concentraciones de 11%, 12% y 13%. Después de disolver bien el medio se esterilizaba mediante autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,2 atmósferas. Las placas de MacConkey se prepararon según la fórmula comercial: 500 g de agar MacConkey (Oxoid CM115) en 9,7 litros de agua destilada. Después de disolver el medio se esterilizaba mediante autoclave durante 15 minutos a 1,2 atmósferas.

INOCULACION DE LAS PLACAS. A partir de un cultivo en agar glucosado de Sabouraud se preparaba una suspensión celular de cada cepa de un 2 de MacFarland, dichas suspensiones se inoculaban en la base del replicador incluyendo siempre cepas controles. Las placas con cada uno de los compuestos químicos se inocularon con un replicador de Steer's automático incluyendo controles de crecimiento sin compuestos químicos. Las placas ya inoculadas se dejaron secar durante media hora y se incubaron en estufa a 30°C, realizándose lecturas a las 24h, 48h y 72h.

LECTURA DE LAS PLACAS. Un aislamiento se consideró positivo cuando se

observó crecimiento visible en las placas al cabo de 24, 48, 72 h respecto al control positivo de crecimiento. Un aislamiento se consideró negativo cuando transcurrido este tiempo no se apreció crecimiento claramente visible. Los resultados positivos para cada uno de los compuestos químicos utilizados se indicaron del siguiente modo: U= crecimiento en presencia de urea, C= crecimiento en citrato, F=resistente a 5-Fluorocitosina, B= resistente a ácido bórico, K= resistente a una concentración de NaCl del 11%. KK= resistente al NaCl al 12% o al 13% y L= crecimiento en placa de MacConkey.

3.4 MORFOTIPADO

PRINCIPIO. Se aplicó el método descrito por Phonpaigchit y col. 1987 (221), basado en el desarrollo de una serie de características fenotípicas del margen de la colonia y de la colonia propiamente dicha, cuando los organismos crecían en placas con extracto de malta.

CEPAS A ESTUDIAR. Cada uno de los aislamientos se subcultivó en placas de agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol (Difco) y fueron incubadas toda una noche (24 horas) a 37°C para estar seguros de que no había contaminación bacteriana.

PREPARACION DE LAS CEPAS. Las cepas bien aisladas se siembran en 1/6 de placa de Yeast Morphology Agar (Difco) tres veces sucesivas incubando las dos primeras veces a 37°C durante 24 horas y la tercera a 28°C toda la noche.

PREPARACION DEL INOCULO. A partir del cultivo en Bacto YMA de 24 horas se preparó una suspensión de células en agua destilada estéril de aproximadamente 10^7 células por ml.

PREPARACION DEL MEDIO. Se empleó agar extracto de malta (agar extracto de malta Oxoid, 60 g; agar Difco 12 g; agua destilada hasta 1 litro). Se mezclaban bien los componentes, calentándolos hasta que se disolvían completamente y se controlaba el pH que debía ser de aproximadamente 5,4. Se distribuían 500 ml en un matraz de 1000 ml y se esterilizaba en autoclave a 115°C durante 10 minutos. Este medio se destruye con temperaturas altas y enfriamientos prolongados, por lo que es importante envasarlo en pequeñas cantidades y enfriarlo lo antes posible. Cuando está a 50°C se distribuía en placas petri estériles de 20 ml.

INOCULACION DE LAS PLACAS. Antes de su utilización las placas eran incubadas durante 20 min. a 37°C para eliminar restos de humedad y gotas de condensación. Cada

suspensión era entonces inoculada haciendo una línea diametral mediante el uso de una torunda estéril embebida en cada una de las suspensiones y parcialmente escurrida en los lados del tubo donde se realizaron las suspensiones de levaduras.

INCUBACION. Las placas inoculadas fueron entonces incubadas en oscuridad durante 10 días a 28°C. No se apilaron nunca más de 4 placas para no modificar las condiciones de incubación en las distintas cepas de levaduras ensayadas.

LECTURA. Después de la incubación durante 10 días a 28°C se realizó una comparación visual de las distintas morfologías desarrolladas y se asignó un código numérico de 4 cifras, atendiendo a las características de la superficie de la colonia y a características de los bordes desarrollados por cada una de las colonias. Los códigos asignados a cada una de las características morfológicas se reseñan en la Tabla 2.

TABLA 2. Características morfológicas consideradas en el morfotipado.

CARACTERISTICA	CODIGO	TIPO
MARGEN DISTRIBUCION	0	AUSENCIA
	1	DISCONTINUO: AFECTA HASTA EL 20% DEL BORDE
	2	DISCONTINUO: AFECTA DEL 20-50%
	3	DISCONTINUO: AFECTA DEL 60-90%
	5	CONTINUO: SOLO DISTALMENTE EN FORMA DE ABANICOS
	7	CONTINUO: EXTREMOS PARALELOS
ANCHURA	0	AUSENTE
	2	2mm O MENOS
	3	3-5mm
	5	MAS DE 6mm
TEXTURA	0	AUSENTE
	1	MUY GRUESO
	2	GRUESO
	3	INTERMEDIO
	4	FINO
COLONIA	0	LISA
	1	NODULAR
	2	AGUJERADA
	4	CRATERIFORME
	5	CRATERIFORME + PLIEGUES O ARRUGAS
	6	PLIEGUES O ARRUGAS
	8	PELUDA

3.5 MORFOTIPADO II

Siguiendo el criterio de códigos empleado por Hunter (114), se recodificaron los biotipos encontrados en el morfotipado I, con el fin de obtener un número de biotipos más manejable que mejorara la reproducibilidad.

En el nuevo criterio se dio prioridad a la formación o no de márgenes en la colonia y la anchura y grosor de dichos márgenes.

El nuevo código se denominó Morfotipado II siendo los morfotipos posibles los siguientes:

- SB = Colonia sin borde
- BD = Borde de la colonia discontinuo
- BEG = Borde de la colonia estrecho y grueso
- BEF = Borde de la colonia estrecho y fino
- BAG = Borde de la colonia ancho y grueso
- BAF = Borde de la colonia ancho y fino

3.6 MORFOTIPADO EN AGAR DE SABOURAUDTRIFENILTETRAZOLIO (AST)

Se utilizó la técnica de Quindós y colaboradores, según una comunicación personal de Manuel Fernández Rodríguez (236) .

Las colonias crecidas en agar de Sabouraud-trifeniltetrazolio mostraban diferencias a nivel de textura de la colonia, color de ésta, borde y la presencia o no de halo de hifas alrededor de la colonia.

METODO: Se preparaba agar de Sabouraud-trifeniltetrazolio con cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (Sigma) 0,1g, peptona 10 g, glucosa 20 g, agar 20 g, y agua destilada hasta 1 litro, se esterilizaba en autoclave y se distribuía en cantidades de 40-50 ml. en placas petri de 15 cm. Las placas se inoculaban inmediatamente o se guardaban a 4°C durante no más de 8 semanas. Cada aislamiento se mantenía en picadura en agar blando guardados a 4°C. Antes de la preparación de cada inóculo, cada aislamiento se sembraba en agar de Sabouraud glucosa y se incubaba a 37°C durante 48 horas. Entonces se cogían 3-4 colonias y se resuspendían en 1 ml. de agua destilada ajustándolo a un MacFarland de 5. Antes de la inoculación, todas las placas se incubaban invertidas a 37°C hasta que desaparecía cualquier gota de condensación. Las placas se inocularon en duplicado con 10 µl de la suspensión celular. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 6 días. Después de la incubación, se le asignó un código de 4 letras de acuerdo con su morfología colonial: textura, L=lisa y

R=rugosa; color, R=rosa (Pantone 176C), N= rosa anaranjado fuerte (Pantone 1785C), V= violeta (Pantone 251C), M=violeta oscuro (Pantone 262C), B=blanco..., presencia de halo, S=si y N=no: y presencia de halo micelial, S=si y N=no. El código NC se uso cuando no se observó crecimiento.

3.7 CARACTERIZACION SUBESPECIFICA EN BASE A PERFIL DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS (PSA).

Otra técnica de tipado considerada en este estudio fueron las posibilidades del perfil de sensibilidad a los antifúngicos método para tipado de levaduras.

CEPAS A ESTUDIAR. Cada una de las cepas se subcultivó en agar de Sabouraud suplementado con gentamicina y cloranfenicol y se incubó 24 horas a 30°C.

MEDIO. El medio utilizado fue agar morfológico para levaduras (YMA, Difco 0393-15).

PREPARACION DE LAS PLACAS. Cuando el medio estaba a unos 50°C se mezclaba 1 ml de solución de antifúngico con 19 ml de agar en un matraz y se vertía en las placas dejando que éstas se enfriaran. De cada antifúngico ensayado se prepararon placas a 4 concentraciones.

ANTIFUNGICOS. Se utilizaron 8 sustancias valoradas: actidiona o cicloheximida (Sigma), miconazol (Esteve), econazol (Esteve), ketoconazol (Esteve), clotrimazol (Bayer), ciclopirox (Hoesch), y fluconazol (Pfizer).

PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK. Se prepararon 10 ml de solución madre para cada uno de los antifúngicos con una concentración de 1280 µg/ml, empleando la siguiente fórmula para realizar la pesada:

$$\text{mg} = \frac{\text{V (ml)} \times \text{C (ug/ml)}}{\text{P (µg/mg)}}$$

Siendo V= volumen de solución de antifúngico que queremos preparar, C= concentración de la solución madre, P= potencia de la sustancia valorada de antifúngico que empleamos.

Los solventes y diluyentes empleados en cada caso se indican en la siguiente tabla:

<u>ANTIFUNGICO</u>	<u>SOLVENTE</u>	<u>DILUYENTE</u>
Anfotericina B	DMSO	H ₂ O
Miconazol	DMSO	H ₂ O
Econazol	DMSO	H ₂ O
Clotrimazol	DMSO	H ₂ O
Ciclopirox	DMSO	H ₂ O
Ketoconazol	H ₂ O pH 2,4 (0,1N ClH)	H ₂ O
Fluconazol	H ₂ O	H ₂ O

CONCENTRACIONES UTILIZADAS. Actidiona: se preparó una única placa con una concentración de 0,05g/l. Miconazol, econazol, ketoconazol, clotrimazol, ciclopirox, fluconazol: se prepararon 3 placas con concentraciones de 16-2-0,5 µg/ml.

Anfotericina B: se prepararon 3 placas con concentraciones de 2-1-0,5 µg/ml

PREPARACION DEL INOCULO. A partir el cultivo en agar de Sabouraud con gentamicina y cloranfenicol se prepararon suspensiones celulares del 0,5 de MacFarland utilizando un nefelómetro.

INOCULACION DE LAS PLACAS. Antes de la inoculación, las placas se colocaron en estufa durante 20 minutos aproximadamente para eliminar los restos de agua de condensación existentes en su superficie. La inoculación se realizó con un replicador automático de 36 puntas, incluyendo a cada uno de los antifúngicos una placa control de agar morfológico para levaduras (YMA, Difco).

INCUBACION. Las placas inoculadas se dejaron secar y se incubaron a 30°C durante 48 h.

LECTURA. Se realizó en un lugar iluminado sobre fondo oscuro comparando las placas de antifúngico con las placas control sin él. Se consideró positivo cuando las zonas inoculadas crecían como el control o al menos cubrían abundantemente toda la zona inoculada. Se consideró negativo cuando crecían colonias sueltas o de forma continua como un velo fino (249).

CODIGOS ASIGNADOS:

0= cepas que no crecían a la concentración de 0,5 µg/ml para los imidazoles, anfotericina B y actidiona.

1 = cepas que crecían a las concentraciones de 0,5 µg/ml y 2 µg/ml pero no lo hacían a 16 µg/ml en el caso de los imidazoles; que crecían a las concentraciones de 0,5 µg/ml y/o 1 µg/ml pero no lo hacían a 2 µg/ml en el caso de anfotericina B, y que crecían bien a la concentración de 0,5 µg/ml de actidiona.

2 = cepas capaces de crecer a una concentración de 16 µg/ml para los imidazoles y de 2 µg/ml para la anfotericina B.

Cada uno de los diferentes perfiles encontrados se identificó con un código alfanumérico cuya equivalencia se indica en la Tabla 3.

TABLA 3. Perfiles de resistencia a antifúngicos encontrados en las levaduras estudiadas.

BIOTIPO	A	M	E	K	C	F	CI
F1	0	0	0	0	0	0	1
F2	0	0	0	0	0	1	1
F3	0	0	0	0	0	2	1
F4	0	0	0	1	0	1	1
F5	0	0	0	1	0	2	1
F6	0	0	0	2	0	1	1
F7	0	0	0	2	0	2	1
F8	0	0	1	2	0	2	1
F9	0	1	0	0	0	0	1
F10	0	1	0	0	0	1	1
F11	0	1	0	0	0	2	1
F12	0	1	0	1	0	2	1
F13	0	1	0	2	0	1	1
F14	0	1	0	2	0	2	1
F15	0	1	1	0	0	2	1
F16	0	1	1	2	0	2	1
F17	0	1	2	2	0	2	1
F18	0	2	0	2	0	2	1
F19	0	2	1	0	0	2	1
F20	0	2	2	2	0	2	1
F21	1	0	0	2	0	2	1
F22	0	0	1	1	2	2	1
F23	0	0	2	1	0	2	1
F24	0	1	0	1	0	1	1
F25	0	1	1	1	0	2	1

BIOTIPO	A	M	E	K	C	F	CI
F26	0	1	1	2	1	1	1
F27	0	1	2	0	0	2	1
F28	0	1	2	1	0	1	1
F29	0	2	0	1	2	2	1
F30	0	2	1	0	0	1	1
F31	0	2	1	1	0	2	1
F32	0	2	1	2	1	1	1
F33	0	2	2	2	1	1	1
F34	0	2	2	2	1	2	1
F35	1	0	0	0	0	0	1
F36	1	1	1	2	1	2	1
F37	1	2	2	1	2	2	1
F38	0	0	0	0	0	1	0
F38	0	2	2	0	0	2	0
F40	2	0	0	0	0	0	1
F41	1	0	0	1	0	0	1
F42	1	0	0	1	0	2	1
F43	2	0	0	0	0	2	1
F44	0	0	0	0	2	2	1
F45	0	1	2	1	0	2	1
F46	0	0	1	0	0	0	1
F47	0	0	2	0	0	2	1
F48	0	0	1	0	0	0	1
F49	0	1	2	1	0	2	1

4. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS (CMD).

Se empleó una técnica de dilución en agar, utilizando un replicador de Steer's

automático, siguiendo la técnica de Rotowa (249).

CEPAS. Cada una de las cepas a estudiar se subcultivó en SAB y se incubó a 30°C durante 48 horas antes de su uso.

ANTIFUNGICOS. Se ensayaron: anfotericina B (Squibb), miconazol, econazol, ketoconazol (Esteve), clotrimazol (Bayer), ciclopirox olamina (Hoesch), fluconazol (Pfizer) y ajo fresco.

MEDIO. Se utilizó YMA después de hacer un estudio comparativo utilizando YNB tamponado y sin tamponar, A3 con agar, Sabouraud, MH, y YMA con tampón y sin él (datos personales no publicados).

SOLUCIONES STOCK. Se prepararon concentraciones madre de cada uno de los antifúngicos de 2560 µg/ml, menos de anfotericina B que fue de 640 µg/ml y de ajo que se realizó licuando 100 g. de ajo fresco y mezclándolo con 100 ml de agua destilada estéril para preparar la primera dilución. La pesada, los solventes y diluyentes utilizados se especifican en el apartado de la caracterización en base al perfil de sensibilidad a los antifúngicos.

DILUCIONES. Para cada uno de los antifúngicos se preparó una batería de 13 tubos largos de cristal de 18x2 cm estériles. Las diluciones se prepararon en agua destilada a partir de la solución madre siguiendo el esquema propuesto por Washington (302).

PREPARACION DE LAS PLACAS. Se preparó el YMA siguiendo las indicaciones y calculando los litros según el trabajo que se iba a realizar cada día. Cada una de las placas para las 13 diluciones de cada antifúngico se preparó mezclando en un matraz 18 ml de agar y 2 ml de la dilución apropiada. Las placas ya preparadas se dejaban secar toda una noche.

INOCULACION. A partir del cultivo en SAB de 48 horas se realizó una suspensión celular de cada una de las cepas en solución salina al 0,9%, ajustándolo con espectrofotómetro a un 85% de transmitancia. Posteriormente se hacía una dilución 1:10 y cada uno de los microorganismos se inoculaba en el replicador de Steer's automático en tandas de 36, incluyen siempre cepas controles. Las placas eran entonces sembradas con ayuda del inoculador automático del replicador. Una vez inoculadas se dejaban secar y se incubaban en estufa a 30°C durante 48 horas.

LECTURA. La lectura se realiza bajo una lámpara y sobre una superficie oscura.

INTERPRETACION DE LA CMI. La CMI se interpretó como la concentración más

baja que inhibía el crecimiento del 75% de la población, respecto al control de crecimiento positivo sin antifúngico.

5. ANALISIS ESTADISTICO

El software empleado para el manejo de datos fue el programa DBASE III plus. El texto y las gráficas que aparecen en este trabajo se procesaron con los programas Word Perfect 5.1 y Harvard Graphics. El estudio estadístico se realizó gracias a la colaboración del Dr. Javier Zamora del Departamento de Biología Aplicada de la Cátedra de Estadística utilizando un SPSS/PC+. Este método permitió el análisis de frecuencias de todos los caracteres considerados en esta Tesis, la realización de tablas cruzadas para múltiples variables, el análisis de distancias entre biotipos dentro de un método de tipado determinado y el análisis de la correlación existente entre los distintos métodos de tipado estudiados.

El soporte hardware consistió en un ordenador IBM 386 con pantalla y teclado y una impresora marca "Hewlett Packard", modelo LaserJet III plus.

6. COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS

6.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS

La **operatividad (simplicidad)** de cada método ha sido calculado mediante la descomposición de este parámetro en los siguientes parámetros parciales:

- No necesidad de un equipamiento especial
- Facilidad en la preparación de reactivos
- Estabilidad de productos y reactivos
- Sencillez del protocolo técnico
- Corto tiempo de realización
- Facilidad de interpretación

A cada uno de estos parámetros parciales, se le asignó una puntuación variable entre 1 y 100. Con la media aritmética de dichos valores se calculó el grado de simplicidad global.

La **eficacia** se estudió desglosada en tres valores: tipabilidad, reproducibilidad y discriminación. La **tipabilidad** de un método se interpretó como la proporción de una población de aislamientos que pueden ser tipados con un método (119). La **reproducibilidad** se interpretó como la proporción de cepas que dan el mismo biotipo cuando se repite la prueba después de varios meses (119). La **discriminación** se consideró como la estimación de su habilidad para diferenciar entre dos cepas no relacionadas (119).

6.2 DISTANCIAS ENTRE BIOTIPOS: DENDROGRAMAS DE SIMILITUD

Para medir las distancias entre biotipos se utilizó un método de clasificación multivariable, denominado análisis de cluster. El objetivo era obtener representaciones gráficas bidimensionales que mostraran la similitud y cercanía taxonómica entre los diferentes biotipos estudiados (13a,22,118).

Como medida de distancia taxonómica entre los biotipos se usó la distancia Euclídea ordinaria. Como algoritmo de clasificación se utilizó un método jerárquico aglomerativo denominado Baverage o método del promedio entre grupos (**average linkage between groups**).

Finalmente, de entre los posibles resultados que ofrece el análisis de cluster, se eligió la representación gráfica en forma de dendrogramas para su inclusión en esta Tesis, por su facilidad de lectura y calidad informativa (22,88,113,118).

6.3 RELACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS

Se analizó si los métodos de tipado estudiados guardaban algún tipo de relación entre sí, o si por el contrario valoraban características independientes.

Esta posible relación entre los distintos métodos estudiados se analizó mediante un Análisis Factorial de Correspondencias entre todas las parejas de métodos posibles. Para ello se empleó el Subprograma Anacor versión 0.4 del Departamento de Teoría de Datos de la Universidad de Leiden, Holanda, incluido en el módulo Categories del SPSS/PC+.

El análisis factorial de correspondencias es un método multivariable de reducción de dimensiones, válido para variables cualitativas medidas a nivel nominal. El objetivo de este

método es la interpretación de tablas de frecuencias de múltiples categorías. Este método resume la información de estas tablas describiendo sintéticamente pautas de relaciones entre variables y categorías. Para ello, se obtiene un espacio reducido, el de los factores (o dimensiones) que condensa al máximo la información original. Finalmente se obtienen gráficas bidimensionales de la representación de las distintas categorías en el plano formado por los factores. De los resultados ofrecidos por este análisis, fueron de gran utilidad por un lado el porcentaje de inercia (varianza explicada) o información retenida por los dos primeros factores extraídos por el análisis y como representación gráfica la posición en el plano formado por estos factores, de los distintos biotipos presentes en los dos métodos analizados (13a,88,118).

IV. RESULTADOS

1. INCIDENCIA DE LEVADURAS DE INTERES MEDICO EN NUESTRO HOSPITAL

La especie aislada en la mayoría de los casos fue C. albicans, con una frecuencia relativa del 43,2%, que representó el 58,9% de los aislamientos orales, el 65% de los aislamientos procedentes de muestras genitales, el 42,4% de los aislamientos de orina, el 17,3% de los aislamientos de muestras de piel y faneras y el 42,4% de los aislamientos invasivos. En cuanto a su distribución en cada tipo de muestra, C. albicans se aisló con más frecuencia en las muestras orofaríngeas, donde se encontraron el 33,5% de las cepas, seguido de las muestras invasivas (22,3%) y las muestras genitales (20,8%).

C. tropicalis le siguió en frecuencia con un porcentaje del 14,5%. Se encontró en un 30,6% de las muestras de orina, un 17,8% de las muestras orofaríngeas, un 17% de las muestras invasivas, un 9,8% de las muestras de piel y faneras y un 5% de las muestras de genitales. En cuanto a su predilección anatómica, un 30,2% de las cepas de C. tropicalis se localizaron en la región orofaríngea y se mostró invasiva en un 27% de los casos.

C. parapsilosis fue el siguiente microorganismo aislado con una frecuencia relativa del 12,2%, encontrándose en un 32,3% de las muestras de piel y faneras, en un 5% de las muestras de orina, un 4% de los aislamientos invasivos, un 2,8% de las muestras orofaríngeas y un 1,7% de las muestras genitales. En cuanto a su distribución en los distintos orígenes, C. parapsilosis mostró una enorme selectividad por las muestras de piel y faneras puesto que el 81,1% de las cepas se aislaron de estas muestras. Hubo un 7,5% de cepas que se aislaron de infecciones invasivas.

La siguiente levadura en frecuencia de aislamiento fue T. beigelii que se encontró en un 5,3% de las muestras positivas. Se aisló en un 5,1% de las muestras de origen interno, en un 5% de las muestras procedentes de genitales, un 3,7% de las de la región orofaríngea y un 0,8% de las de muestras de piel y faneras. El 47,8% de las cepas de T. beigelii procedían de muestras de piel y faneras, un 21,7% de infecciones invasivas, un 17,4% se aislaron de orofarínge y un 13% de muestras genitales.

C. glabrata le siguió en frecuencia con un porcentaje de 4,1% de los aislamientos de levaduras. Se encontró en un 13,3% de las muestras genitales. En cuanto a su distribución según los orígenes de aislamiento, un 44,4% eran de muestras genitales, un 27,8% de invasivas y en el 11,1% se aislaron de muestras de piel, faneras y orofaríngeas.

C. guilliermondii fue aislada en un 3,9% de los casos, representando un 9% de los aislamientos de piel y faneras. En cuanto a su distribución en los distintos tipos de muestras,

mostró una gran selectividad por las muestras de piel y faneras donde se encontraron el 70,6% de las cepas de dicha levadura, un 23,5% se aislaron de muestras orofaríngeas y un 5,9% de muestras genitales.

C. krusei se aisló con una frecuencia relativa del 3% encontrándose un 38,5% de las cepas en muestras orofaríngeas y otro 38,5% en muestras de piel y faneras, un 15,4% en muestras genitales y un 7,7% de las cepas fueron invasivas.

El siguiente microorganismo en frecuencia fue C. neoformans aislado con una frecuencia relativa del 2,3%. Todos los aislamientos encontrados tuvieron carácter invasivo.

C. lusitanae se aisló en un 2,1% de los casos, con un 44,4% de cepas que fueron invasivas, un 22,2% se aislaron de muestras orofaríngeas, otro 22,2% se encontró entre muestras de piel y faneras y un 11,1% de muestras genitales.

C. famata se aisló en un 1,4% de los casos, comportándose una de las cepas como invasiva y el resto se encontraron en muestras orofaríngeas y de piel y faneras. El resto de especies de Candida spp aisladas representó en su conjunto el 1,7% de las cepas, aislándose del 5,3% de las muestras de piel y faneras, del 1,7% de las muestras genitales, del 4% de las muestras internas, un 0,9% de las muestras orofaríngeas y un 2,8% de las muestras de orina.

R. rubra y R. glutinis se aislaron en el 1,6% de los casos y siempre en muestras de piel y faneras. G. candidum se aisló en un 1,1% de los casos, representando el 2,3% de las muestras de piel y faneras y el 1,9% de las muestras orofaríngeas. S. cerevisiae se aisló con una frecuencia total del 0,9%, representando un 3% de las muestras invasivas y un 0,8% de las muestras de piel y faneras.

Los porcentajes de las especies aisladas en cada uno de los grupos considerados se reflejan en la Tabla 1. La distribución de cada especie en los grupos de muestras se detallan en la Tabla 2.

2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIFUNGICOS

Dentro de las cepas de C. albicans estudiadas se pudo observar una gran sensibilidad a algunos antifúngicos como la anfotericina B ($CMI_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $< 0,03 - 64 \mu\text{g/ml}$), con un solo aislamiento resistente (0,5%); miconazol ($CMI_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo

<0,03 - >256 $\mu\text{g/ml}$), con un solo aislamiento resistente a más de 256 $\mu\text{g/ml}$; econazol ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 2 $\mu\text{g/ml}$); clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03- 4 $\mu\text{g/ml}$) y extracto de ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/640$, intervalo 1/2560 - 1/320).

Encontramos una sensibilidad más variable a algunos antifúngicos azoles como el ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 8 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - >256 $\mu\text{g/ml}$) donde se encontraron 11 cepas resistentes (5,8%) a concentraciones de 32 $\mu\text{g/ml}$ o mayores y a fluconazol ($\text{CMI}_{90} = >256 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - >256 $\mu\text{g/ml}$) donde hubo 130 cepas con $\text{CMI} >32 \mu\text{g/ml}$ (69,1% de resistencia).

Dentro de los 63 aislamientos de *C. tropicalis* estudiados se pudo apreciar una gran sensibilidad a antifúngicos como la anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,12 - 2 $\mu\text{g/ml}$, econazol ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - 4 $\mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 2 $\mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,25 - 2 $\mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/640$, intervalo 1/1280 - 1/320). Se encontró una sensibilidad variable para otros antifúngicos como el miconazol ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - >256 $\mu\text{g/ml}$) donde se encontraron 2 aislamientos resistentes (3,2%), con un CMI de 64 $\mu\text{g/ml}$ y otros 2 aislamientos con una sensibilidad intermedia (3,2%) que dieron una $\text{CMI} = 8 \mu\text{g/ml}$, ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 16 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - >256 $\mu\text{g/ml}$) donde se encontraron 4 aislamientos resistentes (6,3%) a concentraciones de 32 $\mu\text{g/ml}$ o mayores y 3 aislamientos que podrían ser considerados de sensibilidad intermedia (7,9%) con una $\text{CMI} = 16 \mu\text{g/ml}$ y fluconazol ($\text{CMI}_{90} = 128 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,12 - >256 $\mu\text{g/ml}$), donde un 93% de las cepas se comportaron "in vitro" como resistentes.

Entre los 53 aislamientos de *C. parapsilosis* se encontró una gran sensibilidad a todos los antifúngicos ensayados: para anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 1 $\mu\text{g/ml}$), miconazol ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 4 $\mu\text{g/ml}$), econazol ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 4 $\mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI} = 0,06 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 0,25 $\mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 8 $\mu\text{g/ml}$), fluconazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - >256 $\mu\text{g/ml}$) que tuvo 3 cepas resistentes (5,7%) a concentraciones de 64 $\mu\text{g/ml}$ o mayores y una cepa con sensibilidad intermedia (1,9%) con una $\text{CMI} = 4 \mu\text{g/ml}$ y ajo ($\text{CMI} = 1/640$, intervalo 1/1280 - 1/640).

Dentro de los aislamientos de *C. glabrata* también se encontró una gran sensibilidad a los agentes antifúngicos ensayados: anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - 0,5), miconazol ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$), econazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 1 $\mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo 0,06 - 2 $\mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo <0,03 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI} = 1/640$, intervalo 1/1280 - 1/320). El

agente antifúngico que presentaba más resistencias era el fluconazol ($\text{CMI}_{90} = 128 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,25 - >256 \mu\text{g/ml}$).

Entre los aislamientos de C. guilliermondii también se observó una gran sensibilidad a los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), miconazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 1 \mu\text{g/ml}$), econazol ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 1 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 8 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 8 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,5 - 2 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/320$, intervalo $1/2560 - 1/320$). El fluconazol resultó el agente antifúngico con mayores valores de resistencia ($\text{CMI}_{90} = >256 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - >256 \mu\text{g/ml}$), con 5 aislamientos resistentes (29,4%) a concentraciones de $64 \mu\text{g/ml}$ o superiores.

Dentro de los aislamientos de C. krusei se observó una gran sensibilidad a los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,12 - 1 \mu\text{g/ml}$), miconazol ($\text{CMI}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), econazol ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 2 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 0,06$, intervalo $<0,03 - 1 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($\text{CMI} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 2 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,5 - 2 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/320$, intervalo $1/1280 - 1/160$). Los aislamientos mostraron una mayor resistencia a fluconazol con una $\text{CMI}_{90} = 8 \mu\text{g/ml}$ y un intervalo $1 - >256 \mu\text{g/ml}$.

Los aislamientos de C. lusitaniae estudiados mostraron una sensibilidad variable a los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 32 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,12 - 32 \mu\text{g/ml}$), con un aislamiento resistente (11,1%) a $32 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina B; miconazol ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 2 \mu\text{g/ml}$), econazol ($\text{CMI}_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 2 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($\text{CMI} >256 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,12 - >256 \mu\text{g/ml}$), con 4 cepas resistentes (44,4%) a concentraciones de $128 \mu\text{g/ml}$ o superiores, fluconazol ($\text{CMI}_{90} = 128 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 128 \mu\text{g/ml}$), con 6 cepas resistentes (66,7%) a concentraciones de fluconazol de $32 \mu\text{g/ml}$ o superiores; ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $1 - 4 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/640$, intervalo $1/5120 - 1/640$).

En cuanto a los aislamientos de T. beigeli, encontramos una gran sensibilidad a algunos antifúngicos como ketoconazol ($\text{CMI}_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 8 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($\text{CMI}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($\text{CMI}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 4 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($\text{CMI}_{90} = 1/320$, intervalo $1/2560 - 1/320$). Sin embargo mostró una sensibilidad variable a otros antifúngicos como anfotericina B ($\text{CMI}_{90} = 32 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 64 \mu\text{g/ml}$), con 3 cepas (13%) resistentes a $32 \mu\text{g/ml}$ o más de

anfotericina B; miconazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - >256 \mu\text{g/ml}$), donde hubo una cepa resistente (4,3%) con una $CMI >256 \mu\text{g/ml}$ y otros aislamientos de sensibilidad intermedia con una $CMI = 8 \mu\text{g/ml}$; econazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 64 \mu\text{g/ml}$), con un aislamiento resistente (4,3%) que dio una $CMI = 64 \mu\text{g/ml}$ y otro aislamiento de sensibilidad intermedia que tuvo una $CMI = 8 \mu\text{g/ml}$; fluconazol ($CMI_{90} = 128 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - >256 \mu\text{g/ml}$), con 6 cepas resistentes (26%) a concentraciones de $8 \mu\text{g/ml}$ o superiores.

Los aislamientos de C. neoformans se mostraron muy sensibles a todos los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), para el miconazol, econazol, clotrimazol y ketoconazol tuvieron unas CMI s homogéneas de $0,06 \mu\text{g/ml}$, para el fluconazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($CMI_{90} = 0,06 \mu\text{g/ml}$, intervalo $<0,03 - 0,25 \mu\text{g/ml}$) y por último el ajo ($CMI_{90} = 1/160$, intervalo $1/640 - 1/320$).

Todos los aislamientos de C. famata estudiados mostraron una gran sensibilidad a los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($CMI_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), miconazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), econazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($CMI_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($CMI = 0,06 \mu\text{g/ml}$), fluconazol ($CMI_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 2 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($CMI_{90} = 1/320$, intervalo $1/1280 - 1/320$).

El conjunto de las especies de Rhodotorula estudiadas se mostró bastante sensible a los antifúngicos ensayados: anfotericina B ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), miconazol ($CMI_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), econazol ($CMI_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($CMI_{90} = 0,12 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,12 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($CMI_{90} = 0,12 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,12 \mu\text{g/ml}$), fluconazol ($CMI_{90} = 64 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,25 - 64 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($CMI_{90} = 0,12 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,12 - 2 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($CMI_{90} = 1/320$, intervalo $1/640 - 1/320$).

El resto de especies estudiadas se mostró muy sensible a los antifúngicos estudiados: anfotericina B ($CMI_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,5 \mu\text{g/ml}$), miconazol ($CMI_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), econazol ($CMI_{90} = 0,12 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 0,25 \mu\text{g/ml}$), ketoconazol ($CMI_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), clotrimazol ($CMI_{90} = 0,5$, intervalo $0,06 - 2 \mu\text{g/ml}$), fluconazol ($CMI_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 4 \mu\text{g/ml}$), ciclopirox ($CMI_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$, intervalo $0,06 - 2 \mu\text{g/ml}$) y ajo ($CMI_{90} = 1/320$, intervalo $1/1280 - 1/160$).

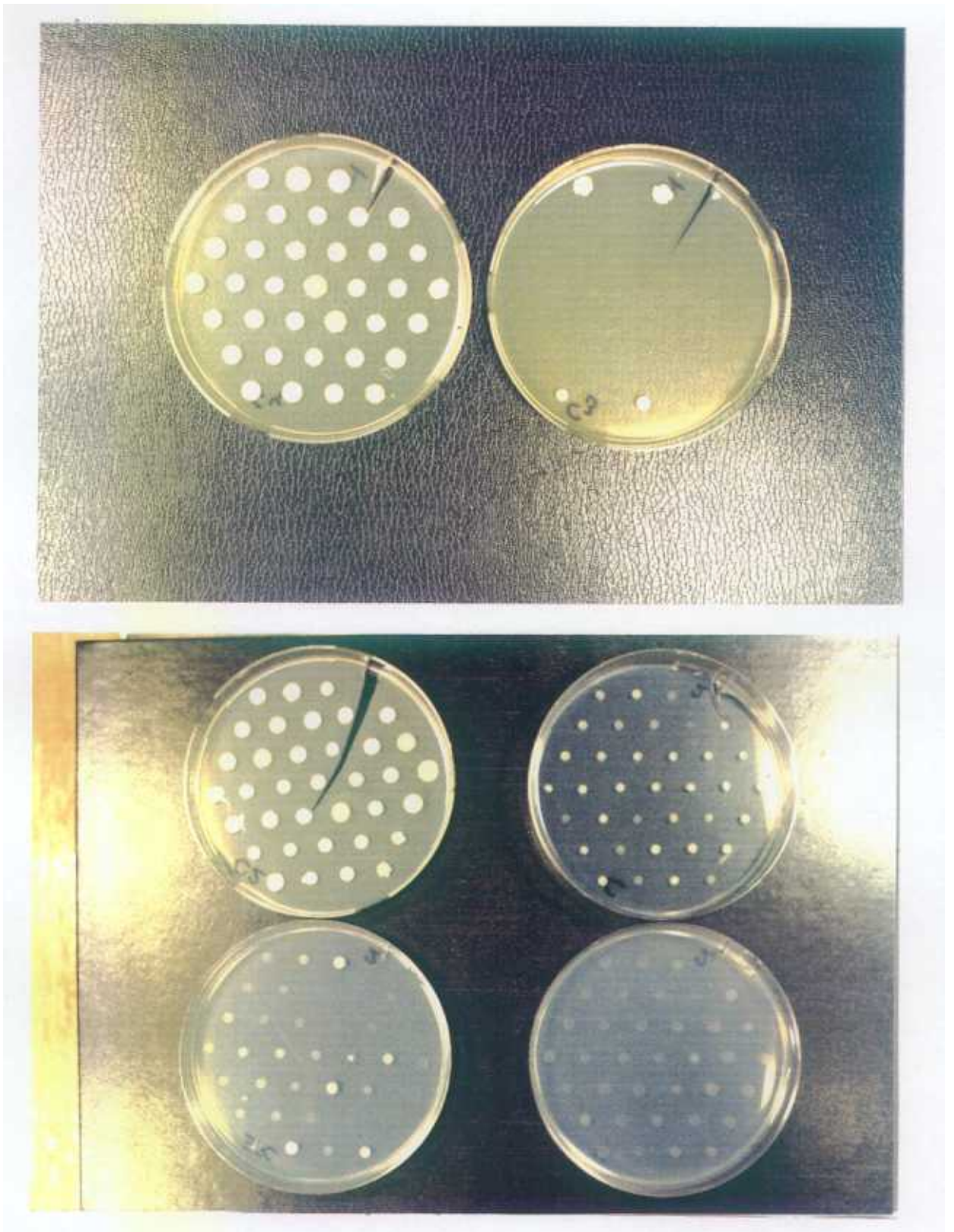


Foto 1. Aspecto morfológico de las colonias de levaduras creciendo sobre placas de agar con concentraciones sucesivamente crecientes de anfotericina B (arriba) y de ketoconazol (abajo).

Los antibióticos ensayados así como la CMI50, CMI90 y el intervalo para cada una de las especies estudiadas se refleja en la Tabla 3a y 3b. En la Tabla 4 se indican las CMIs que mostraron las cepas control incluidas. En la Figura 1 se puede observar cómo crecían las cepas de levaduras sobre el medio de agar con concentraciones sucesivamente crecientes de anfotericina B y de ketoconazol.

3. METODOS DE TIPADO DE LEVADURAS

3.1 BIOTIPADO POR SISTEMA API 20C AUX

En C. albicans se encontraron 10 biotipos diferentes, de los cuales el biotipo 2576174 fue el más frecuente, presentándose en el 76,6% de los casos. Los demás biotipos mostraron frecuencias mucho menores, siendo el segundo biotipo más importante el 2556174 con una frecuencia relativa del 6,9%, seguido de 2776174 en un 4,8% de las cepas. El biotipo 2566174 apareció con una frecuencia del 3,7% y el biotipo 6576174 con una frecuencia del 2,7%. Los 5 biotipos restantes tuvieron unas frecuencias entre 1,6% y 0,5%.

Entre las muestras orofaríngeas el biotipo mayoritario fue el 2576174 en un 76,2%. El segundo biotipo más frecuente fue el 2776174 en un 7,9%, que reunió en estas muestras el 55,6% de las cepas con dicho biotipo. Entre las muestras genitales el biotipo dominante también resultó ser el 2576174 en un 71,8%, seguido del 2556174 en un 10,3%. Entre las muestras de piel y faneras el biotipo mayoritario fue el 2576174 en un 69,6% de las cepas, seguido del 2556174 en el 13%. Entre las muestras de orina ocurrió lo mismo: 2576174 (76,2%) y 2556174 (14,3%). En las cepas invasivas de C. albicans, el 2576174 también fue el biotipo mayoritario (85,7%), seguido del 2566174 (7,1%) donde se agruparon el 42,9% de las cepas con dicho biotipo.

Los números de aislamientos correspondientes a cada uno de los biotipos API20C AUX encontrados en los distintos grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 5.

En C. tropicalis se encontraron 11 biotipos, siendo el más frecuente el 2556175 en un 34,9% de los casos, seguido del 2576175 en un 27% y el 2556375 en el 12,7% de los aislamientos. Hubo dos biotipos con una frecuencia relativa del 6,3% : 6556135 y 6556175. Los biotipos restantes tuvieron una frecuencia del 1,6%.

Entre las muestras orofaríngeas el biotipo principal fue el 2556175 en el 36,8%,

seguido del 2576175 en el 31,6% y del 2556375 en el 21,1%. Los 3 aislamientos encontrados en muestras genitales dieron morfotipos diferentes. Entre las muestras de piel y faneras hubo dos biotipos dominantes, el 2556175 y el 2576175, ambos con una frecuencia relativa del 30,8%, seguido del 6556135 en el 15,4%. El resto de los biotipos presentes lo hicieron con una frecuencia del 7,7% (6556175, 6566174, 6576175). Entre las muestras de orina predominó el biotipo 2556175 en un 45,5%, seguido del 6556175, donde se agruparon el 75% de las cepas con dicho biotipo. En las muestras invasivas predominó el biotipo 2556175 en un 35,3%, seguido del 2576175 en el 29,4% y el 2556375 en el 11,8%.

En el caso de C. tropicalis encontramos 11 biotipos que se diferencian por la capacidad variable de cada biotipo para asimilar glicerol, arabinosa, adonitol, xilitol, inositol, metil-D-glucosidasa, N-acetil-glucosamina, galactosa, celobiosa, trehalosa y melizitosa. El biotipo 2556175 fue el más aislado con una frecuencia del 34,9%, seguido de 2576175 en el 27%, 2556375 en el 12,7%, los biotipos 6556135 y 6556175 ambos en el 6,3% y el resto con una frecuencia del 1,6%. El biotipo 2556175 fue el más frecuente en todas las muestras analizadas. En las muestras orofaríngeas, de piel y faneras y cepas invasivas el segundo biotipo en importancia fue 2576175. En las muestras de orina el segundo biotipo más aislado fue 6556175, que fue tercero entre las muestras de piel. El tercero en frecuencia en las cepas invasivas y las orofaríngeas fue el biotipo 2556375.

Los biotipos API20C AUX encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 6.

Entre los aislamientos de C. parapsilosis se encontraron 11 biotipos diferentes de los cuales 6756135 fue el más frecuente representando un 35,8% de la población, seguido del 6756135 en un 28,3% y el 6752135 en un 11,3%. El biotipo 6772175 apareció con una frecuencia del 5,7% y con unas frecuencias del 3,8%, los biotipos 2746174, 2752175, 6656175. El resto de los biotipos mostraron una frecuencia del 1,9%.

Las 3 cepas encontradas en muestras orofaríngeas dieron biotipos diferentes (2746174, 6656175, 6756175). La única cepa encontrada en muestras genitales mostró el biotipo 6656175, en las muestras de piel y faneras predominó el biotipo 6756175 (37,2%), seguido del 6756135 en el 25,6% y el 6752135 en el 14%, donde se agruparon los seis aislamientos con dicho biotipo. Quince de las 43 cepas aisladas en las muestras de piel dieron biotipos que sólo se encontraron en estas muestras.

Los 11 biotipos de C. parapsilosis se diferenciaron por la variabilidad en la asimilación de glicerol, arabinosa, adonitol, xilitol, sorbitol, MDG y trehalosa.

Los biotipos API20C AUX encontrados en dicha especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados viene especificado en la Tabla 7.

Los aislamientos de T. beigelii estudiados mostraron 13 biotipos diferentes, con dos biotipos mayoritarios que representaron el 17,4% (2744774) y el 13% (2744775) de la población. Hubo 5 biotipos con una frecuencia del 8,7% (2740775, 2744777, 2745737, 2545775 y 6745775) y los 6 biotipos restantes tuvieron una frecuencia del 4,3%. Entre las muestras orofaríngeas se encontraron 3 biotipos, siendo el más frecuente el 2744775 que representó el 50% de las cepas aisladas en boca y el 67% de las cepas con dicho biotipo. Los 3 aislamientos de T. beigelii encontrados en muestras genitales dieron biotipos diferentes. Entre las muestras de piel y faneras se encontraron 2 biotipos mayoritarios, 2744777 y 2745737, que tuvieron una frecuencia del 18%. Los otros 7 biotipos encontrados en estas muestras tuvieron frecuencias del 9%. El biotipo mayoritario entre las cepas invasivas fue 2744774 que representó el 40%. Hubo 2 biotipos (6757775 y 6767774) que sólo se encontraron entre las cepas virulentas.

Los biotipos API20C AUX encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras consideradas se refleja en la Tabla 8.

Entre los aislamientos de C. glabrata sólo se encontraron 4 biotipos diferentes siendo uno de ellos mayoritario (2000040), que representó el 83,3% de la población, los otros 3 biotipos restantes estuvieron representados por un sólo aislamiento cada uno y se localizaron en una muestra genital (2000100) y dos muestras de piel (2000041 y 6000040).

Los biotipos API20C AUX encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se expresa en la Tabla 9. Los biotipos API20C AUX observados en las cepas control ensayadas se detallan en la Tabla 10. En la Figura 2 se puede observar como era el API 20C AUX realizado a una cepa de C. albicans de nuestra colección, con biotipo 2576174.

3.2 PERFIL ENZIMATICO

Se estudió el perfil enzimático de 435 levaduras de nuestra colección utilizando las 19 enzimas hidrolíticas contenidas en la galería API ZYM para evaluar sus posibilidades como herramienta para tipar levaduras.

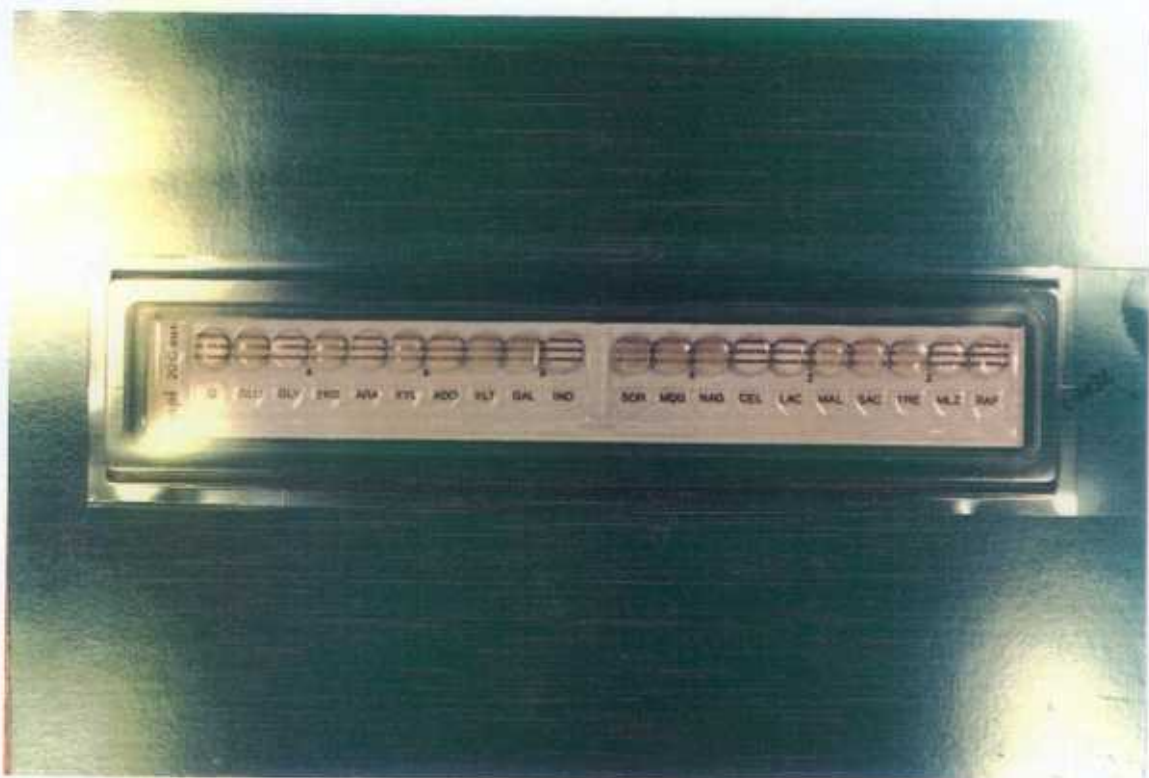


Foto 2. Aspecto de una cepa de C. albicans creciendo en una galería API 20C AUX. La cepa fotografiada tenía el biotipo 2576174.

Con la galería API ZYM detectamos 19 perfiles enzimáticos en *C. albicans*, destacándose 4 biotipos mayoritarios, el E10 en un 37,8%, el E1 en un 14,1% y el E16 en un 10,3%. Se encontraron 7 biotipos con una frecuencia relativa de 1,1% o menos.

Cuando se analizó la distribución de estos perfiles en cada tipo de muestras, E10 resultó el perfil mayoritario entre las cepas invasivas, (31,7%⁹, orofaríngeas (13%), genitales (53,8%) y de piel y faneras (34,8%) y el segundo en frecuencia entre las muestras de orina (19%). E1, resultó el segundo biotipo en importancia entre las cepas invasivas (19,5%) y de piel y faneras (21,7%), y fue el primero en frecuencia entre las muestras de orina (28,6%). El tercer perfil enzimático, E16, se distribuyó en los distintos tipos de muestras ocupando el segundo lugar en frecuencia entre las muestras genitales (20,5%) y de cavidad orofaríngea (9,8%). E12, que se encontró en un porcentaje del 9,7%, fue el tercer perfil encontrado entre las cepas invasivas (12,2%). Otros perfiles enzimáticos menos frecuentes fueron E6 que apareció con una frecuencia relativa del 6,5% y representó un 13% de las muestras de piel y uñas, y un 7,3% de las cepas invasivas; E11 que se aisló en un 3,2% de los casos y E4 un 2,7%, encontrándose 3 de las cinco cepas en muestras orofaríngeas. E18 también tuvo una frecuencia relativa del 2,7% y 3 de las cinco cepas resultaron invasivas. E17, se encontró en un 2,2% de los casos y 3 de los cuatro aislamientos se localizaron en muestras orofaríngeas. Entre los biotipos de baja frecuencia destacaron E8 (0,5%⁹, E13 (1,1%), E19 (1,1%) y E21 (1,1%) que solo se localizaron entre las muestras orofaríngeas y E9 (0,5%) y W15 (1,6%) que fueron cepas virulentas.

Los perfiles enzimáticos encontrados en esta especie y su distribución en los grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 11.

La mayoría de los aislamientos de *C. albicans* poseían actividad fosfatasa alcalina, esterasa C4, esterasa lipasa C8, lipasa C14, leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, α glucosidasa y N-acetil- β glucosaminidasa.

Entre los aislamientos de *C. tropicalis* se encontraron 15 perfiles diferentes, siendo 3 de ellos mayoritarios y el resto minoritarios, compartiendo seis de ellos con *C. albicans*. El perfil más frecuente fue E16 en un 28,3% de los casos, coincidiendo con el perfil mayoritario encontrado en *C. albicans* que resultó ser el perfil más frecuente entre las muestras de genitales (66,7%), orofaríngeas (33,3%) y muestras de orina (55,6%). Representó el 13% de las cepas invasivas. Le siguió en frecuencia el perfil E36 que representó un 18,9% de los casos, fue el biotipo más frecuente de las muestras superficiales (36,4%) e invasivas (20%) y el segundo en frecuencia entre las muestras genitales (33,3%) y de orina (22,2%). El tercer perfil en frecuencia fue E10 en un 11,3% de los casos que se localizó en un 20% de las cepas invasivas y un 13,35 de las muestras orofaríngeas. E35

apareció con una frecuencia relativa del 7,5% con tres de cuatro aislamientos localizados en muestras orofaríngeas. Otros perfiles que aparecieron con menor frecuencia fueron E31 (3,8%), E34 (1,9%), E38 (1,9%) y E39 (1,9%) que se localizaron sólo en cepas virulentas.

Los perfiles enzimáticos encontrados en C. tropicalis así como su distribución en los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 12.

C. tropicalis presentó un perfil similar a C. albicans pero mostró en menor proporción las actividades lipasa C14 y Nacetil β glucosaminidasa. La mayoría de las cepas presentó actividad β glucosidasa que en C. albicans fue muy reducida.

En C. parapsilosis se encontraron 13 perfiles diferentes, compartiendo tres de ellos con C. albicans. El biotipo mayoritario fue E11 en un 37,5%. E13 le siguió en un 18,8% y E23 en el 10,4%. Hubo 5 biotipos representados por un sólo aislamiento.

E11, fue el perfil mayoritario entre las muestras de piel y faneras (38,5%) y el 66,7% de las orofaríngeas, además de uno de los tres aislamientos de C. parapsilosis que resultaron virulentos. El siguiente perfil en frecuencia fue E13 que resultó el segundo perfil más frecuente entre las muestras de piel y faneras y tuvo un aislamiento con capacidad invasiva. El tercer perfil importante fue E23, con una frecuencia relativa del 10,4% que se encontró sólo en muestras superficiales (12,8%). Le siguió E26 en un 6,3% de las cepas que fue el único aislamiento de muestras genitales y los dos de orina. Por último destacar E15 en un 4,2% con un aislamiento en muestras de piel y faneras y otro con capacidad invasiva.

Los perfiles enzimáticos encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se detalla en la Tabla 13.

C. parapsilosis comparada con C. albicans presentó un menor porcentaje de actividades lipasa C14 y cistina arilamidasa, sólo un 2% poseía actividad β glucosidasa y no mostró actividad Nacetil β glucosaminidasa.

Entre los aislamientos de T. beigelijii se encontraron 14 perfiles enzimáticos diferentes, con dos de ellos mayoritarios y el resto representados por una sola cepa. El perfil mayoritario agrupó el 30% de las cepas con 3 aislamientos de piel, 2 orofaríngeas y una cepa virulenta. El segundo biotipo de interés fue E21 (10%) que se localizó solo en orofaringe. Entre los perfiles minoritarios fueron de interés E19, E47 y E48 (5% cada uno) que se encontraron sólo en cepas virulentas, y E34 y E50 que fueron los dos aislamientos de muestras genitales.

Los perfiles enzimáticos observados en esta especie así como su distribución en los

grupos de muestras considerados vienen reflejados en la Tabla 14.

En cuanto a los aislamientos de C. glabrata se encontraron 5 perfiles enzimáticos representando E15 el 64,7% del total que coincidió con el perfil mayoritario de las cepas invasivas (60%) y las cepas encontradas en muestras de piel y faneras, orina y orofaríngeas. Los perfiles E3 (11,8%) y E38 (5,9%) incluyeron los otros dos aislamientos de C. glabrata que resultaron invasivos.

Los perfiles enzimáticos encontrados en dicha especie así como su distribución en los diferentes grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 15. Los perfiles enzimáticos encontrados en las cepas control utilizadas se refleja en la Tabla 16.

La actividad fosfatasa alcalina la presentaron la mayoría de los aislamientos estudiados pero no todos. La actividad esterasa C4 y esterasa lipasa C8 se observaron en todas las levaduras evaluadas dando igual el género o especie al que pertenecían. La actividad lipasa C14 mostró una gran variabilidad. La actividad leucina arilamidasa estuvo presente en casi todos los aislamientos estudiados excepto en C. parapsilosis donde se observó en un 96.6% de los mismos. La actividad tripsina, quimi tripsina y α fucosidasa no estuvieron presentes en ninguno de los aislamientos ensayados. Las actividades fosfatasa ácida y fosfoamidasa estuvieron presentes en el 95% o más de los aislamientos. la actividad α galactosidasa se observó en un número escaso de cepas de C. albicans (0.5%), T. beigelii (4.3%) y C. glabrata (5.5%). La actividad β galactosidasa sólo la presentaron T. beigelii en el 34.8% de los aislamientos y C. glabrata en el 5.5%.

Las actividades α glucosidasa, β glucosidasa y Nacetil- β glucosaminidasa fueron extremadamente variables en las distintas especies estudiadas oscilando su presente entre el 0% para C. glabrata y el 95.2% en el caso de C. tropicalis para la α glucosidasa. La actividad α fucosidasa se detectó en muy pocos casos.

Los porcentajes de actividad enzimática observados en las especies más frecuentes para la 19 enzimas ensayadas se expresan en la Tabla 17.

En la Figura 3 se muestran los API ZYM realizados a algunos de los aislamientos de nuestra colección. Dichos perfiles corresponden a las siguientes especies indicadas en orden de arriba hacia abajo: C. albicans, C. tropicalis, C. neoformans, T. beigelii y C. parapsilosis.



Foto 3. Perfil enzimático mostrado por algunos aislamientos de levaduras de nuestra colección utilizando la galería API ZYM. 1: C. albicans, 2: C. tropicalis, 3: C. parapsilosis, 4: T. beigelii, 5: C. neoformans.

3.3 RESISTOTIPADO

Dentro de los aislamientos de C. albicans encontramos 23 resistotipos diferentes de los cuales cuatro fueron mayoritarios y el resto fueron minoritarios. El primer resistotipo encontrado en frecuencia fue OCOBOOO que representó un 20,7% de la población, seguido de OCOOOOO en un 17%. El resistotipo OCOBOOO fue el resistotipo más frecuente entre las muestras genitales (28,2%) y de piel y faneras (43,5%), el 19% de las muestras de orina y el 19% de las cepas invasivas. El segundo resistotipo en frecuencia, OCOOOOO, fue el mayoritario entre las muestras orofaríngeas (22,2%) y las cepas invasivas (21,4%), el segundo en frecuencia entre las muestras genitales (13%) y el 19% de las muestras de orina. El tercer resistotipo mayoritario fue OCOBOOL que representó el 12,8% de la población y se encontró en el 19% de las cepas virulentas, el 14,3% de las muestras de orina y el 21,7% de las muestras de piel y faneras. OOOBOOO tuvo una frecuencia del 9,6% del total de aislamientos y fue el segundo resistotipo en frecuencia entre las cepas de muestras orofaríngeas y genitales y 4 cepas de origen invasivo. OOOOOOO también tuvo una frecuencia relativa del 9,6%, siendo el primer resistotipo en frecuencia entre las muestras de orina y el tercero entre las muestras orofaríngeas.

Los resistotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados en este estudio se detallan en la Tabla 18.

En cuanto a la resistencia a cada uno de los compuestos químicos utilizados en esta técnica, se observó que las resistencias a 5-fluorocitosina se localizaban en las muestras orofaríngeas (14,3%), frente al 0% en piel. En cuanto al citrato los porcentajes oscilaron entre un 61,9% en muestras de orina y el 86,9% de las muestras de piel y faneras. La resistencia a ácido bórico osciló entre el 47,6% de los resistotipos de muestras de orina y el 86,9% de las de muestras de piel y faneras. Solamente el 7,1% de los biotipos de orina fueron resistentes a sal frente al 26,9% de los resistotipos de muestras orofaríngeas. En cuanto a la capacidad de crecer en MacConkey no se observaron diferencias entre los resistotipos encontrados en C. albicans encontrados en las distintas áreas anatómicas.

Dentro de los aislamientos de C. tropicalis se encontraron 20 resistotipos diferentes de los cuales OCOBOOO fue el mayoritario en el 38,1% de los casos coincidiendo con el resistotipo mayoritario de C. albicans. Fue el resistotipo más importante entre las muestras orofaríngeas (36,8%), genitales (66,7%), de origen interno (35,3%), orina (45,5%) y muestras de piel y faneras (30,8%). El segundo resistotipo importante fue OCOBKKO, con una frecuencia relativa del 9,5%, que fue el segundo biotipo encontrado entre las cepas invasivas. El resto de los resistotipos estuvieron representados por tres o menos aislamientos,

aunque fue de destacar UCOBKOO (4,8%) que sólo se localiza en muestras orofaríngeas donde fue el segundo resistotipo en frecuencia (15,8%), OCOBKOO (3,2%) que fue el segundo resistotipo encontrado en importancia entre las muestras de orina (18,2%) y OCFBOOL (3,2%) que resultó el segundo en frecuencia entre los aislamientos de piel y faneras (15,4%).

Los 20 resistotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 19.

En cuanto a la resistencia a compuestos químicos se observó que un 66,6% de los resistotipos de las muestras genitales eran resistentes a 5-fluorocitosina frente al 0-1% de las cepas invasivas y de las de orinas. Los tres aislamientos resistentes a urea se localizaron entre las muestras orofaríngeas. La resistencia a citrato, en C. tropicalis osciló entre el 9% en los resistotipos de muestras de orina y el 100% en las muestras genitales. En cuanto al ácido bórico, no hubo grandes variaciones, oscilando entre el 76,5% en el caso de las cepas virulentas y el 100% de los resistotipos de muestras genitales y de orina. No hubo ninguna cepa de muestras genitales capaz de crecer a las concentraciones de sal utilizadas en este estudio, mientras que sí lo hicieron el 41-45% de los resistotipos encontrados entre las cepas invasivas y las de orina. En placas de agar de MacConkey no creció ninguna cepa procedente de muestras genitales y sí lo hicieron hasta un 46% de las cepas de muestras de piel y faneras.

Entre los aislamientos de C. parapsilosis se encontraron 13 resistotipos diferentes de los cuales tres fueron los mayoritarios. OCOBKKL representó el 30,2% del total y se encontró sólo entre muestras de piel y faneras (37,2%). Le siguió en frecuencia OOOBKKL, con una frecuencia relativa del 15,1%, que fue el segundo resistotipo en frecuencia entre las muestras de piel y faneras. El tercer resistotipo en frecuencia fue OCOOKKL en un 13,2% de los casos y que fue el tercer resistotipo más frecuente entre las muestras de piel y faneras. OOOOKKL tuvo una frecuencia relativa del 11,3% y representó el 50% de los resistotipos encontrados entre las muestras invasivas. El 81,1% de los aislamientos de C. parapsilosis se localizaron en piel y faneras y de ellos el 72% de los resistotipos fueron resistentes a citrato, el 11,6% fueron resistentes a 5-fluorocitosina, el 65,1% lo fueron a ácido bórico, el 86% a las concentraciones de sal empleadas y el 95,3% fueron capaces de crecer en MacConkey.

Los 13 resistotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 20.

Dentro de los aislamientos de T. beigelii se encontraron 9 resistotipos diferentes. El resistotipo más frecuente fue OCFBOOL que representó un 21,7% del total de cepas y se

localizó en una cepa invasiva, una oral y tres de muestras de piel y uñas. Le siguió en frecuencia OOOBOOO en un 17,4% de los casos, representando el segundo biotipo más frecuente en muestras de piel y faneras (3 cepas). Hubo 3 resistotipos con una frecuencia del 13%, OCFBOOO que se encontró en una cepa invasiva y dos de piel, OOOBOOL, que se encontró en un aislamiento oral y dos de origen genital y OOOOOOO que coincidió con un aislamiento oral y dos cepas invasivas. UCFBOOL apareció con una frecuencia del 8,7% y se encontró en una cepa invasiva y otra de piel. El resto de los resistotipos tuvo una frecuencia del 4,3% y representaron un único aislamiento en cada caso.

Los 9 resistotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 21.

En C. glabrata se encontraron 9 resistotipos de los cuales OOOBKOO fue el más frecuente en el 33,3% de los casos, representando el 60% de las muestras invasivas, el 100% de las muestras de orina y el 25% de las genitales. El siguiente resistotipo en frecuencia fue OOOBOOL en el 22,2% de los aislamientos, que representó el 20% de las cepas invasivas, el 25% de las muestras genitales y el 50% de las muestras orales. OOOBKKO apareció con una frecuencia del 11,1% y se encontró en el 20% de las muestras invasivas y el 50% de las muestras orofaríngeas. El resto de los resistotipos tuvo una frecuencia relativa del 5,6%.

Los 9 resistotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 22.

No encontramos ningún aislamiento de C. albicans o de C. parapsilosis capaces de crecer un presencia de urea. En C. tropicalis hubo un 4,8% de cepas resistentes a la concentración de urea utilizada, en T. beigelii un 8,7% y en C. glabrata un 5,6%.

En la Figura 4 aparecen algunos de los medios utilizados para la determinación de los resistotipos.

A la concentración de citrato utilizada fueron capaces de crecer un 72,8% de los aislamientos de C. albicans, un 80,9% de C. tropicalis, un 66% de C. parapsilosis, un 47,8% de T. beigelii y un 11,1% de C. glabrata. En presencia de 5FC creció un 9% de C. albicans, un 12,7% de C. tropicalis, un 9,4% de C. parapsilosis, un 56,5% de T. beigelii y un 5,6% de C. glabrata. La concentración de ácido bórico utilizada no inhibió el 64,9% de C. albicans, el 82,5% de C. tropicalis, el 56,65 de T. beigelii y el 94,4% de C. glabrata. A concentraciones de un 11% de NaCl resistieron un 18% de C. albicans, un 34,9% de C. tropicalis, un 84,9% de C. parapsilosis y un 61,1% de C. glabrata. T. beigelii fue completamente inhibido a esta concentración.

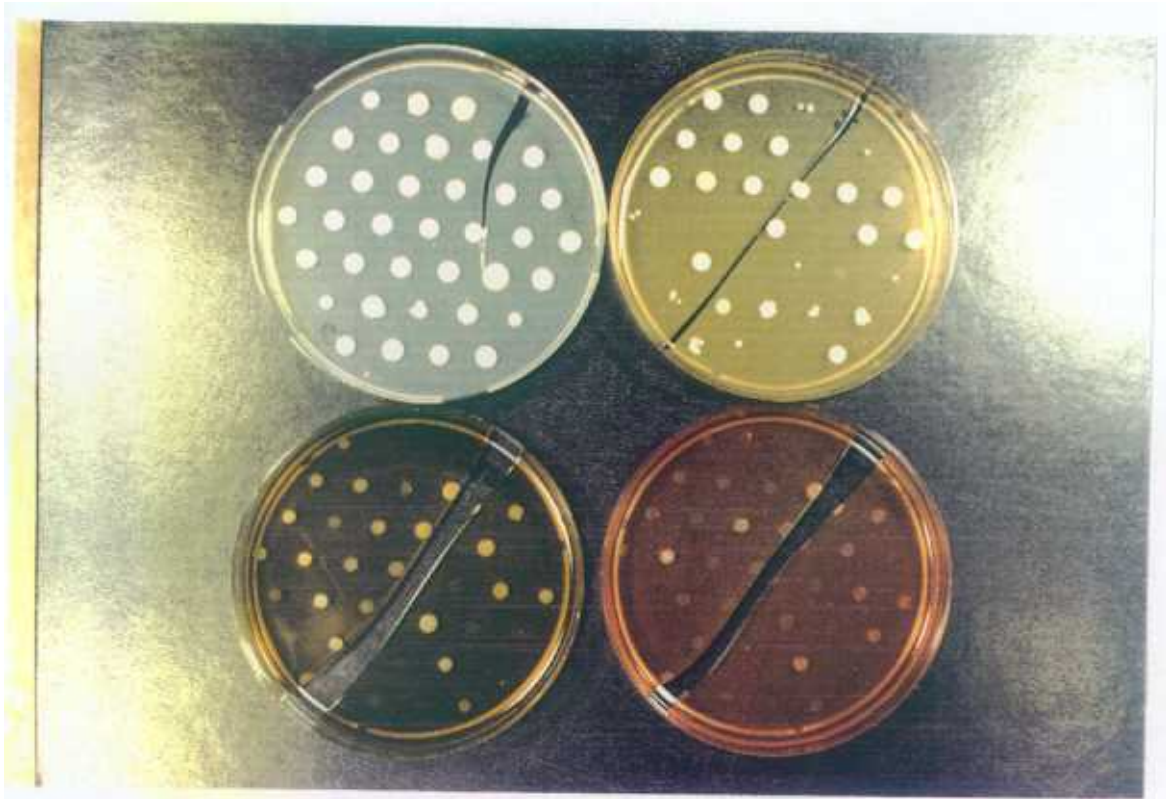


Foto 4. Aspecto de las colonias de levaduras creciendo sobre placas de agar con algunos de los compuestos químicos utilizados para la determinación de los resistotipos.

Para una concentración de 13% de sal hubo un 0,5% de resistencia en C. albicans, un 19% en C. tropicalis, un 79,2% en C. parapsilosis y un 27,8% en C. glabrata. En placas de MacConkey fueron capaces de crecer un 27,1% de C. albicans, un 23,8% de C. tropicalis, un 94,3% de C. parapsilosis, un 52,2% de T. beigelii y un 44,4% de C. glabrata.

Las frecuencias relativas de resultados positivos a cada uno de los compuestos químicos utilizados en la técnica de resistotipado para las 5 especies mayoritarias se expresan en la Tabla 23. Los resistotipos encontrados en cada una de las cepas control ensayadas se indican en la Tabla 24.

3.4 MORFOTIPADO I

De entre los 435 aislamientos de levaduras estudiados, se encontraron 73 morfotipos diferentes. En C. albicans se obtuvieron 46 morfotipos diferentes, de los cuales 7540 fue el más frecuentemente observado en un 34,6% del total de aislamientos. Le siguieron en importancia los morfotipos 7340 con una frecuencia relativa del 10,6%, 0000 en un 6,9% de los aislamientos y 7330 en un 5,9%. Se encontraron 11 morfotipos con una frecuencia relativa del 1,1% y 23 morfotipos que se aislaron con una frecuencia del 0,5% cada uno.

En cuanto a la distribución de los distintos morfotipos de C. albicans en cada tipo de muestra, encontramos que el morfotipo mayoritario, 7540, era el más frecuentemente encontrado en muestras orofaríngeas, representando el 42,9% de estas. Le siguieron en frecuencia nueve (39,1%) de los 23 morfotipos unitarios que se detectaron y que representaron el 14,4% de estas muestras. El siguiente morfotipo de interés entre estas muestras fue el morfotipo 0000 que se encontró en un 6,3% de dichas muestras. Por último, cabe destacar que dos de los tres aislamientos con morfotipo 7320 procedían de muestras orales. Entre las muestras genitales destacó el morfotipo 5340, con un 66,7% de las cepas con dicho morfotipo localizadas en estas muestras. Le siguió el morfotipo 7330, un 63,6% de cuyas cepas se aislaron de muestras genitales. Los aislamientos de piel y faneras estuvieron representados en su inmensa mayoría por morfotipos minoritarios. El más frecuente fue el morfotipo 7540, que en el 43,5% se localizó en muestras de piel, aunque dentro de estas muestras su frecuencia fue sólo del 15,4%. En las muestras de orina el morfotipo 7540 también fue el mayoritario representando el 38,1% de estas muestras. Los morfotipos unitarios se encontraron en un 14,4% de los casos y el resto estuvo representado por morfotipos con bajas frecuencias. Entre las cepas virulentas se encontraron dos morfotipos específicos de dichas muestras, 3220 y 5321 (100%). El morfotipo 7340 se encontró en estas muestras con una frecuencia del 45%.

Los morfotipos I encontrados en esta especie así como su distribución en los diferentes grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 25.

Entre los aislamientos de C. tropicalis estudiados, se encontraron 19 morfotipos diferentes. El más importante fue el morfotipo 7540, que reunió el 33,3% de las cepas y que coincidió con el morfotipo mayoritario encontrado en C. albicans. Le siguieron en frecuencia el 7546 en un 22%, el 0000 en un 11,1% de los casos y el 5214 en el 6,2%. Hubo 13 morfotipos que estuvieron representados por un único aislamiento.

Entre las cepas de C. tropicalis procedentes de muestras orofaríngeas, el morfotipo mayoritario fue el 7540, donde se concentró el 52,6% del total de dicho morfotipo. Hubo dos morfotipos que sólo se encontraron en estas muestras, el 7336 y el 7516. Las tres cepas que procedían de muestras genitales mostraron morfotipos diferentes: 5540, 7542 y 7546.

El morfotipo 0000 se localizó en un 42,9% de las muestras de piel y faneras, y el morfotipo 5214 lo hizo en un 75% de sus cepas. Hubo dos morfotipos que sólo se encontraron en dichas muestras: 5341 y 7548. El morfotipo más común entre las muestras de orina fue 7546 que representó el 54,5% de las muestras de orina, seguido de 7540 en un 18,2% y de tres morfotipos exclusivos de dichas muestras: 7334, 7346 y 7532. Entre los aislamientos con carácter invasivo se encontraron un 35,3% de las cepas con morfotipo 7540 y 7 aislamientos de los 11 restantes mostraron morfotipos que no se encontraron entre las demás muestras.

Los morfotipos I encontrados en esta especie así como su distribución en cada uno de los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 26.

C. parapsilosis mostró poca variabilidad ya que sólo un aislamiento manifestó características en el borde de la colonia. De los 7 morfotipos encontrados, 0006 fue el mayoritario, representando un 50% del total de aislamientos. Le siguieron en frecuencia 0000 en el 24,5%, 0001 en el 9,4% de las cepas y 0004 en el 7,5%. En muestras de piel y faneras se localizaron el 81,1% de los aislamientos de C. parapsilosis. El morfotipo mayoritario entre las muestras invasivas y las orofaríngeas fue 0006, con porcentajes del 75% y del 67% respectivamente.

Los morfotipos I encontrados en dicha especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 27.

En el caso de T. beigelij, se encontraron 11 morfotipos diferentes siendo los más frecuentes el 7541 en el 26,15 de los casos seguido del 7548 y 7511, ambos en un 13%.

Otros morfotipos como 7536, 7540 y 7546 se observaron con una frecuencia del 8,7%. Entre las muestras orofaríngeas se encontraron dos aislamientos con morfotipo único para estas muestras: el 7516. Entre los aislamientos genitales hubo uno de tres aislamientos específico para estas muestras (5318). Entre las muestras de piel y faneras el morfotipo mayoritario fue el 7511 con una frecuencia del 27,3% y 4 de nueve aislamientos correspondieron con dos morfotipos característicos de estas muestras. En las muestras invasivas 4 de siete cepas correspondieron a morfotipos específicos, siendo el morfotipo mayoritario el 7541 con una frecuencia del 40%.

Los morfotipos I encontrados en esta especie así como su distribución en cada uno de los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 28.

Los porcentajes de positividad a cada una de las características consideradas en el morfotipado I para las 5 especies mayoritarias estudiadas se reflejan en la Tabla 29.

Los morfotipos I encontrados para cada una de las cepas control incluidas en este estudio se indican en la Tabla 30.

3.5 MORFOTIPADO II

En C. albicans se encontraron los 7 morfotipos posibles, siendo BAF el más frecuente en el 41% de las cepas, seguido de BD en el 24,5% y de BEF en un 22,3% de la población. Entre las muestras orofaríngeas BAF, fue el morfotipo mayoritario que agrupó el 49,2% de dichas muestras. Le siguieron en frecuencia BEF en un 15,9% y BD en el 12,7%. La única cepa de C. albicans con morfotipo BAG se localizó en estas muestras. Entre las muestras genitales, el morfotipo mayoritario fue BAF en un 41% de las cepas de dichas muestras, seguido de BEF en el 33,3% y de BD en el 10,3%. Las muestras de piel y faneras tuvieron también como morfotipo mayoritario BAF en un 52,2% de los casos, seguido de BD en el 17,4% y de BEF en el 13%. Entre las muestras de orina, BAF siguió siendo el más frecuente en el 47,6% de las cepas, seguido de BD en el 23,8% y BEF en el 14,3%. Entre las muestras invasivas, el morfotipo mayoritario fue BD en el 35,7%, seguido de BEF en el 31% y de BAF en el 19%.

Los morfotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 31.

En C. tropicalis no se encontró ningún morfotipo BD y el morfotipo mayoritario fue

BAF en el 69,3%, coincidiendo con C. albicans. Le siguió en frecuencia SB en el 15,9%. Entre las muestras orofaríngeas BAF fue con mucho el más frecuente en el 78,9%, encontrándose 3 cepas que tuvieron morfotipos SB, BEF y BAG. Las 3 cepas de C. tropicalis encontradas en muestras genitales mostraron morfotipos BD (33%) y BAF (66,7%). Las muestras de piel y faneras tuvieron dos morfotipos mayoritarios SB y BAF con frecuencias del 46,2% cada uno. Un aislamiento tuvo morfotipo BD. Los 11 aislamientos procedentes de muestras de orina tuvieron sólo 2 morfotipos: BAF en un 81,8% y F en el 18,2%. Las muestras invasivas estudiadas tuvieron más variedad de morfotipos encontrándose BAF como morfotipo mayoritario en el 64,7% de los casos seguido de SB en el 17,6% y BD, BEG y BAG en el 5,9%.

Los morfotipos encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 32.

En C. parapsilosis sólo hubo un morfotipo mayoritario, SB, en el 98,1% de los aislamientos, encontrándose sólo una cepa con morfotipo BEF que se aisló de una muestra de piel. Dichos morfotipos y su distribución en los grupos de muestras considerados vienen indicados en la Tabla 33.

El morfotipo mayoritario en el caso de T. beigelii también fue BAF en un 73,9%, seguido de BAG en un 17,4% y BD en un 8,7%. En las muestras orofaríngeas el morfotipo dominante fue BAF en el 75% y hubo una cepa con morfotipo BAG. Las 3 cepas de T. beigelii encontradas en muestras genitales tuvieron el morfotipo BAF (66,7%) y BD (33,3%). Las muestras de piel y faneras dieron como morfotipo dominante BAF en el 72,7% de los casos, seguido de BAG en el 18,2% y de una cepa con morfotipo BD. Las cepas virulentas mostraron en el 80% de los casos morfotipo BAF, encontrando una cepa con morfotipo BAG.

Los morfotipos encontrados en esta especie así como su distribución en cada uno de los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 34.

La caracterización de otras especies y géneros de levaduras por el método de morfotipado en agar extracto de malta, mostró un predominio del morfotipo SB (sin borde) en la mayoría de estas especies, en muchas de las cuales era el único morfotipo presente, como era el caso de C. glabrata, C. guilliermondii, C. famata, C. neoformans, C. rugosa, C. lusitaniae, etc...

Las frecuencias relativas de aparición de cada uno de los morfotipos II posibles para las 5 especies mayoritarias se indican en la Tabla 35.

Los morfotipos encontrados en las cepas control incluidas en este estudio se detallan en la Tabla 28. En la Figura 5 se pueden observar algunos de los morfotipos presentados por las levaduras sobre agar extracto de malta: colonia con borde discontinuo (BD), sin borde (SB) y con borde ancho y fino (BAF).

3.6 MORFOTIPADO EN AGAR DE SABOURAUD-TRIFENILTETRAZOLIO (AST)

Entre las 435 cepas estudiadas se encontraron 34 morfotipos diferentes. Algunos de dichos morfotipos eran compartidos por varias especies.

En C. albicans se encontraron 17 morfotipos distintos, siendo LRNN el más frecuente en el 46,3%, seguido de LVSN en el 18,1% y de LRSN en el 9,6%. El morfotipo LRNN fue el mayoritario entre las muestras orofaríngeas con una frecuencia relativa del 44,4%, le siguieron en frecuencia LVSN con una frecuencia del 17,5% y LRSN en un 7,9%. Un 66,7% de los aislamientos con morfotipo LRNS se encontraron entre las muestras orofaríngeas, lo mismo que con LVNN, donde 3 de los cuatro aislamientos con dicho morfotipo (75%) se encontraron entre dichas muestras, y los 4 aislamientos con morfotipo RVSN (100%) se encontraron también entre dichas muestras. Entre las muestras genitales el morfotipo más frecuente fue LRNN con una frecuencia relativa del 43,6%, coincidiendo con el morfotipo mayoritario, seguido de LRSN y LVSN que aparecieron con una frecuencia del 15,4%. Los dos únicos aislamientos con morfotipos RRSN y RVBSS se encontraron entre estas muestras. Entre las muestras de piel y faneras el morfotipo más frecuente fue LRNN que apareció con una frecuencia del 39,1% seguido de LVSN con un 26,1%. Un 66,7% de las cepas con morfotipo RRNS se encontraron entre estas muestras. El morfotipo LRNN también fue el más importante entre las muestras de orina y las invasivas, con frecuencias del 61,9% y del 47,6% respectivamente. El otro morfotipo importante entre las muestras invasivas fue LVSN que apareció con una frecuencia del 21,4%. Los dos únicos aislamientos que mostraron morfotipos RRSS y RVSN se encontraron entre las cepas invasivas.

Los morfotipos AST encontrados en esta especie así como su distribución en los distintos grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 36.

En C. tropicalis hubo una gran variabilidad de morfotipos encontrándose 21 diferentes entre las 63 cepas analizadas. LVSS fue el morfotipo mayoritario y representó sólo un 14,3% de los aislamientos. Le siguió en frecuencia RVBNN en un 12,7% y LRNN en el 9,5%. entre los aislamientos de muestras orofaríngeas, los morfotipos mayoritarios fueron LVSS con un 26,6% que representó un 55,6% de todos los aislamientos de dicho morfotipo, LRNN en un

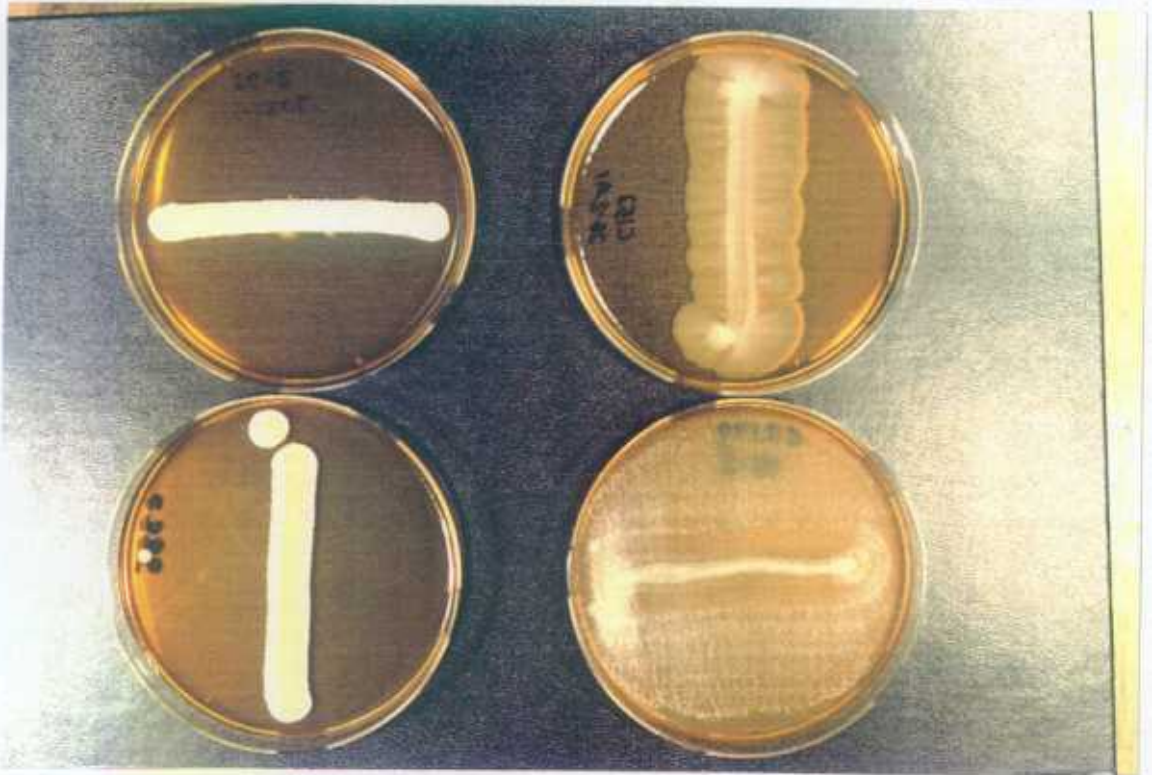
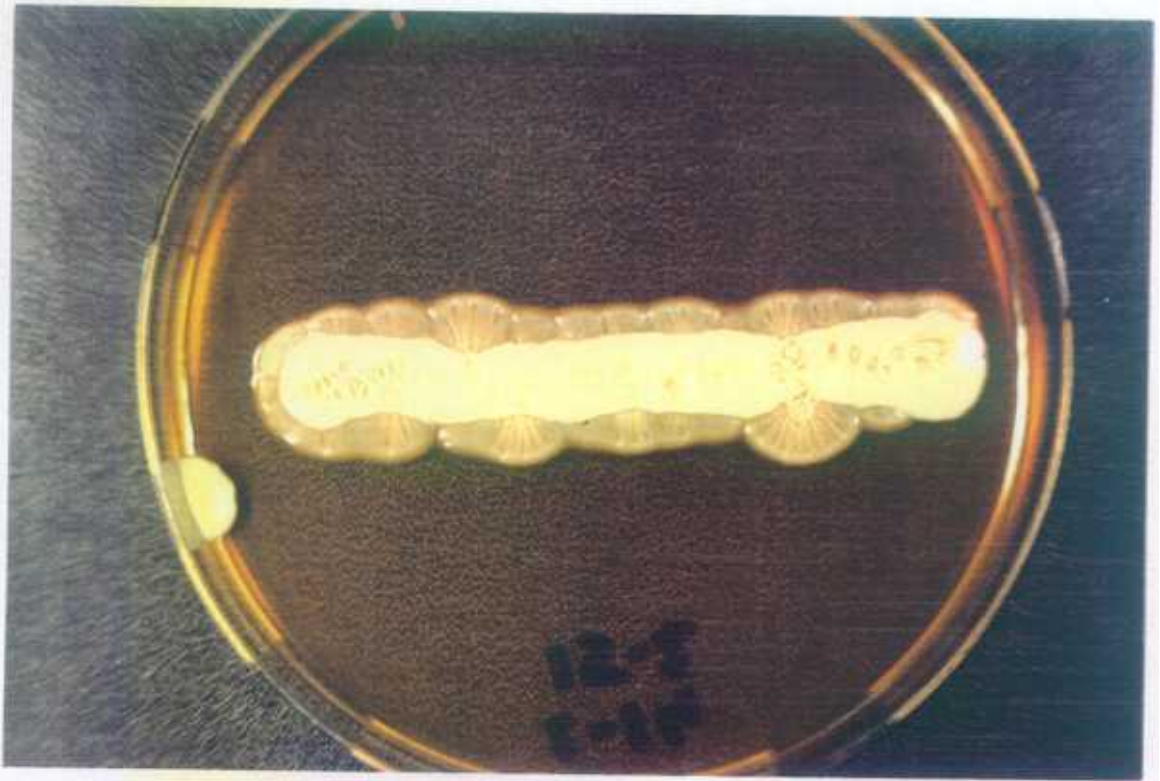


Foto 5. Morfotipos II presentados por algunas cepas de levaduras de nuestra colección sobre agar con extracto de malta. Arriba: morfotipos con borde discontinuo (BD). Abajo: 1,3: morfotipos sin borde (SB); 2,4: morfotipos con borde ancho y fino (BAF).

15%, morfotipo que sólo se encontró en estas muestras y las de piel y faneras y LVBSN y RMNS ambas con una frecuencia del 10,5%. Los 3 aislamientos de C. tropicalis encontrados en muestras genitales mostraron morfotipos distintos. En los aislamientos procedentes de muestras de piel y faneras el morfotipo mayoritario fue LRNN con una frecuencia del 23,1% seguido de RVSN en un 15,4%. Entre las muestras de orina los morfotipos que más destacaron fueron LVBNN donde se concentraron el 66,7% de los aislamientos con dicho morfotipo y el resto se localizaron entre las cepas virulentas. RVBSN también concentró en las muestras de orina el 66,7% de las cepas con dicho morfotipo, encontrándose el aislamiento restante en una cepa aislada de una muestra genital. Entre las muestras invasivas el más frecuente fue LRSN donde se encontraron 3 de los cuatro aislamientos con dicho morfotipo y 4 aislamientos con morfotipo RVBNN que representó el 23,5% de los aislamientos invasivos. Un 50% (2 cepas) de los morfotipos RVSN se encontraron en estas muestras y dos morfotipos específicos de un aislado cada uno se encontraron sólo entre estas muestras.

Los morfotipos AST encontrados para esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 37.

En C. parapsilosis se encontraron 10 morfotipos diferentes. El mayoritario fue RVSN con una frecuencia relativa del 28,3%, seguido de RVNN en un 18,9% y de LVSN en un 13,2%. El 81,1% de los aislamientos se localizaron en piel y faneras, en orina sólo se encontraron dos aislamientos con morfotipo LRNN, entre las muestras invasivas se encontraron 3 morfotipos: LVSN, RVNN y RVSS con frecuencia de 28,6%, 10% y 50% respecto del total de cepas de cada morfotipo. Sólo se encontró una cepa de C. parapsilosis en muestras genitales que dio morfotipo LRNN y en muestras orofaríngeas se encontraron tres aislamientos con morfotipos LVNN, RRNN y RVSN.

Los morfotipos AST encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 38.

Entre los 23 aislamientos de T. beigelii se encontraron 10 morfotipos distintos de los cuales RRNS fue el más frecuente en el 43,5%, seguido de RRSS en un 17,4%, siendo el resto de las frecuencias de los demás morfotipos inferiores al 10%. Entre los cuatro aislamientos de muestras orales todos los morfotipos encontrados fueron diferentes. Entre los aislamientos de muestras genitales RRNS apareció con una frecuencia del 66,7% y RRSN en el 33,3%. Entre las muestras de piel y faneras el morfotipo dominante fue RRNS en el 45,5% y RRSS en el 27%. Entre las muestras invasivas tres aislamientos mostraron morfotipo RRNS, lo cual representó el 60% de las cepas y hubo otros dos aislamientos más, cuyos morfotipos fueron LRNN y RRSS.

Los morfotipos encontrados en esta especie así como su distribución en cada uno de los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 39.

Entre los aislamientos C. glabrata se observó que un 72,2% de los aislamientos no crecían en el medio con lo que resultaban no tipables. Sólo se encontraron 5 cepas capaces de crecer bien en dicho medio que dieron dos morfotipos: RBNN y RRNN. Los morfotipos AST encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 40.

Los resultados globales de las frecuencias relativas obtenidas para cada una de las características consideradas en el método AST se reflejan en la Tabla 41.

Las especies con mayor porcentaje de colonias rugosas fueron C. parapsilosis en un 60,4% y T. beigelii en un 82,6%.

T.beigelii mostró en un 91,3% colonias de color rosa.

C. parapsilosis fue la especie con mayor porcentaje de colonias de color violeta, un 75,5%. Un 34,9% de aislamientos de C. tropicalis fue capaz de producir colonias violetas con un anillo blanco bordeando la colonia. Sólo un 0,5% de C. albicans y un 3,75% de C. parapsilosis produjeron este tipo de colonias.

Un 1% de aislamientos de C. albicans y un 3,2% de C. tropicalis mostraron colonias marrones. Un 11,1% de aislamientos de C. glabrata dieron colonias blancas. Las especies que en mayor proporción presentaron borde de colonia formando un anillo de otro color fueron C. tropicalis, en un 52,4% y C. parapsilosis en un 56,6%. La especie que mostró más frecuencia relativa de halos de hifas alrededor de las colonias fue T. beigelii en el 78,3% de los aislamientos.

Los morfotipos AST observados en las cepas control incluidas en este estudio se indican en la Tabla 42. Algunos de los morfotipos AST encontrados en las levaduras estudiadas, se detallan en la Figura 6.

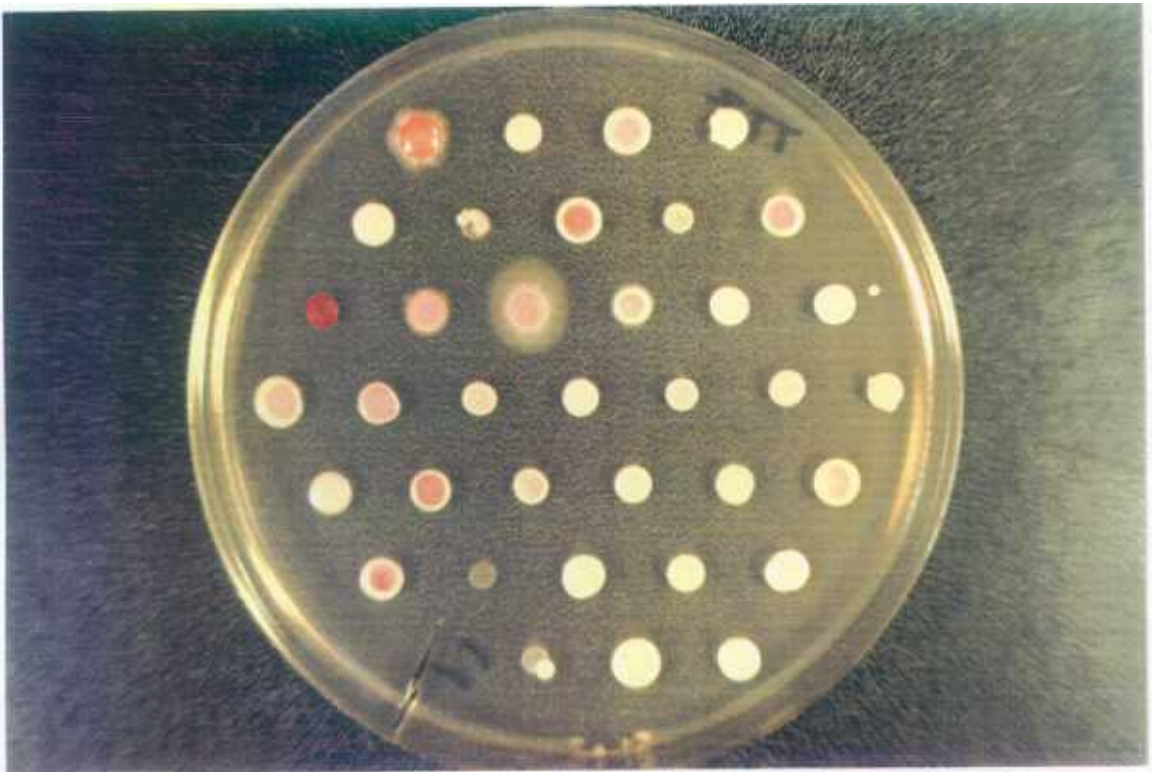


Foto 6. Aspecto que presentaban las colonias de levaduras creciendo sobre de Sabouraud Trifeniltetrazolio. En posición 1 vemos el morfotipo LRNS, en 5: LRNN, en 7: LRSN, en 9: LRSS, en 10: LVNN y en 11: RRNN.

3.7 CARACTERIZACION EN BASE A LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS

Con esta técnica se encontraron un total de 47 perfiles diferentes.

En C. albicans se encontraron 23 perfiles de sensibilidad a los agentes antifúngicos diferentes, siendo F7 el mayoritario en el 22% de los casos. Le siguieron en frecuencia F5 y F14 con un 12,2% y F4 en un 10,5% de las cepas. El perfil F6 apareció con una frecuencia del 8,8% y con una frecuencia del 7,7% lo hicieron F1 y F3. Entre los aislamientos de muestras orofaríngeas el perfil mayoritario fue F7 que tuvo una frecuencia del 22,6%, seguido de F14 en el 14,5% y de F5 que mostró una frecuencia del 11,3%. Hubo 6 perfiles que sólo se encontraron entre estas muestras: F9, F10, F12, F15, F19 y F43. Entre las muestras genitales se encontraron 10 perfiles con frecuencias similares, oscilando entre F7 que tuvo una frecuencia del 15,4%, F1, F4, F6 y F13 que tuvieron una frecuencia del 12,8% y F18 y F22 con frecuencias del 2,6% que sólo se encontraron entre estas muestras. En las muestras de piel y faneras el perfil más importante fue F4 que representó el 23,8% de las cepas, seguido de F7 en el 19% de los casos y F14 en el 14,3%. Entre las muestras de orina el perfil principal fue F7 que representó el 16,7% de las cepas. Hubo 5 perfiles que sólo aparecieron en estas muestras. Dos perfiles se compartieron al 50% con cepas invasivas.

Los distintos perfiles de sensibilidad a antifúngicos encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 43.

Entre los 59 aislamientos de C. tropicalis analizados se encontraron 28 perfiles diferentes. El perfil mayoritario fue F1 que representó sólo el 10% del total de cepas. Entre las muestras orofaríngeas el perfil más importante fue F2 con una frecuencia del 17,4%, perfil que sólo se encontró entre estas muestras. Le siguieron en frecuencia F1, F6, F14, F15 y F25 con una frecuencia del 12%. Hubo un total de 6 perfiles característicos de estas muestras. Entre las muestras genitales sólo se encontraron 3 cepas que mostraron tres perfiles diferentes. Entre las muestras de piel y faneras el perfil mayoritario fue F1 representando el 30,8% de las cepas, seguido de F4 en el 15,4%. Los perfiles restantes encontrados mostraron una frecuencia del 7,7%. En las muestras de orina el perfil más importante fue F7 con una frecuencia relativa del 20%. El resto de los perfiles tuvieron idéntica frecuencia del 10%. Hubo 4 perfiles que sólo se encontraron en estas muestras. Entre las cepas virulentas el perfil mayoritario fue F29 en el 17,7% de las cepas que sólo se encontró entre estas muestras. Le siguieron en frecuencia F6, F7, F12, F26 y F37 en un 11,8%. Hubo 4 perfiles que sólo se encontraron entre estas muestras y dos se compartieron al 50% con las muestras de orina.

Los diferentes perfiles de sensibilidad a antifúngicos encontrados en dicha especie así

como su distribución en los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 44.

Entre los aislamientos de C. parapsilosis se encontraron 12 perfiles, de los cuales F1 fue el más importante representando el 53,8% de las cepas, seguido de F35 en el 13,5% y los demás en frecuencias menores del 10%. Las 3 cepas que se encontraron entre las muestras orofaríngeas tuvieron el mismo perfil F1 y el único aislamiento de las muestras genitales dio perfil F5. Entre las muestras de piel y faneras el perfil principal fue F1 donde se localizaron el 86% de las cepas con dicho perfil. Le siguió con mucha menor frecuencia F35 en el 9,5% de las cepas. La única cepa encontrada en muestras de orina tuvo perfil F35 y las cuatro cepas invasivas mostraron perfiles F35 en un 50% y F1 y F40 en un 25%.

Los perfiles de sensibilidad antifúngica encontrados es esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se detallan en la Tabla 45.

Entre los aislamientos de T. beigelii se encontraron 10 perfiles distintos. El más frecuente fue F1 que representó el 18% de los aislamientos, seguido de F2, F39 y F40 que mostraron una frecuencia del 13,5%. Entre las muestras orofaríngeas hubo dos perfiles F4 y F5 con frecuencias ambas del 50% y sólo se encontraron entre estas muestras. Las tres cepas encontradas entre las muestras genitales tuvieron tres perfiles diferentes. Entre las muestras de piel y faneras F2 y F39 fueron los mayoritarios con una frecuencia del 35% cada uno y sólo se encontraron entre estas muestras. Le siguió en frecuencia f40 con un 20% que compartieron con una muestra invasiva. Entre las muestras invasivas F1 y F3 tuvieron una frecuencia del 40% y F3 sólo se encontró en dos cepas virulentas. Una cepa virulenta tuvo perfil F40 (20%).

Los perfiles de sensibilidad antifúngica encontrados en esta especie así como su distribución en los grupos de muestras considerados se indican en la Tabla 46.

Entre los aislamientos de C. glabrata se encontraron nueve perfiles, siendo el más frecuente de ellos F3 con una frecuencia del 25%, seguido de F1 y F5 que mostraron unas frecuencias relativas del 18,8%. Las dos cepas orofaríngeas dieron perfiles diferentes F3 y F44. Las muestras genitales tuvieron como perfil mayoritario F1 en un 33,3% de los casos, siendo f2 y f19 perfiles encontrados sólo en estas muestras. Entre las muestras de piel y faneras, hubo dos cepas con dos perfiles diferentes F5 y F11. La única cepa encontrada en orina dio perfil f1. El perfil mayoritario encontrado entre las cepas invasivas fue f3 que representó el 40% de dichas cepas seguido de F5, F45 y F47 con un 20%, observándose los dos últimos perfiles sólo entre estas cepas invasivas.

Los perfiles de sensibilidad antifúngica observados en esta especie así como su

distribución en los grupos de muestras considerados se reflejan en la Tabla 47.

A la concentración 2 de anfotericina B, sólo resistieron un 11,3% de aislamientos de C. parapsilosis y un 13% de cepas de T. beigelii. En el caso del miconazol, a la concentración 3 no fueron inhibidas un 2,7% de C. albicans, un 14,3% de C. tropicalis, un 4,3% de T. beigelii y un 6,25% de C. glabrata. Para econazol a concentración 3 solo crecieron un 1,1% de C. albicans, un 14,3% de C. tropicalis, un 4,3% de T. beigelii y un 6,25% de C. glabrata. En el caso de ketoconazol a concentración 3 fueron resistentes el 50,5% de C. albicans, el 30,2% de C. tropicalis, el 3,8% de C. parapsilosis y el 4,3% de T. beigelii. A concentración 3, en el caso de clotrimazol, crecieron un 3,2% de los C. tropicalis y un 6,25% de C. glabrata. En el fluconazol, a concentración 3, no fueron inhibidos un 61,2% de C. albicans, un 38,1% de C. tropicalis, un 13,2% de C. parapsilosis, un 21,7% de T. beigelii y un 75% de C. glabrata. En el caso del ciclopirox, a concentración 3 no hubo ningún aislamiento resistente.

Los resultados globales de las frecuencias relativas de resistencia a las concentraciones antifúngicas utilizadas en este método se reflejan en la Tabla 48.

Los perfiles de sensibilidad antifúngica encontrados en las cepas control incluidas en este estudio se detallan en la Tabla 49.

4. ANALISIS DE LOS BIOTIPOS DE 107 AISLAMIENTOS ORALES DE VIH SEROPOSITIVOS Y NO VIH.

la candidiasis oral es la forma más frecuente de infección en los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia adquirida. En este estudio se trató de buscar mediante los métodos de biotipado si había algún biotipo de levaduras asociado a infecciones en estos pacientes. Nos pareció interesante estudiar estadísticamente los resultados obtenidos en los 107 aislamientos orales diferenciando aquellos que pertenecían a enfermos VIH seropositivos de los que no lo eran. Las especies aisladas en cada una de las dos poblaciones se refleja en la Tabla 50.

En la población no VIH se encontraron 10 especies de levaduras, siendo C. albicans la más frecuente en el 42,3%, seguida de C. tropicalis en el 21,2%. En la población VIH seropositiva sólo se aislaron seis tipos de especies siendo C. albicans la mayoritaria en el 74,5%, seguida igual que en el otro grupo por C. tropicalis en el 14,5%.

La distribución de biotipos API 20C para ambas poblaciones se detalla en la Tabla 51. Se observó que el biotipo mayoritario, 2576174, era el mismo en ambas poblaciones con frecuencias relativas del 39% en la población no VIH y del 64% en la VIH seropositiva. El siguiente biotipo mayoritario fue el 256175 en los no VIH con un porcentaje del 14,6% y el 2576275 en los VIH seropositivos con una frecuencia del 8%.

La clasificación de los resistotipos encontrados en cada una de las poblaciones de aislamientos orales se detalla en la Tabla 52. En los no VIH los resistotipos más frecuentes fueron el OCOBOOO en el 19.5%, el OOOOOOO en el 14.6% y el OOOBOOO en el 12.2%. Los resistotipos más frecuentes en la población VIH seropositiva fueron OCOOOOO en el 24%, OCOBOOL en el 12% y OCOBOOO en el 10% que coincide con el resistotipo mayoritario de la población normal.

La distribución de morfotipos I encontrados en ambas poblaciones se indica en la Tabla 53. El morfotipo mayoritario en ambas series fue el 7540 con frecuencias similares del 39% en los no VIH y del 44% en los VIH seropositivos. El resto de los morfotipos se presentaron de forma minoritario excepto OOOOOOO en los no VIH con un porcentaje del 14,6%.

Los resultados obtenidos en la clasificación de los morfotipos II en las dos poblaciones se refleja en la Tabla 54. No se observaron grandes diferencias en los resultados obtenidos en ambas poblaciones.

Los resultados de la clasificación de los morfotipos en AST para las dos poblaciones objeto de estudio se muestran en la Tabla 55. Se encontró LRNN como biotipo mayoritario en ambas series, pero con frecuencias relativas diferentes del 14,6% en la población no VIH y del 52% en la VIH seropositiva.

La distribución de los perfiles enzimáticos encontrados en las dos poblaciones comparadas se reflejan en la Tabla 56. En ambas poblaciones el perfil mayoritario fue E10 con una frecuencia relativa del 38,1%. Le siguieron en frecuencia E12 y E16, ambos en un porcentaje del 9,5%. Todos los aislamientos que mostraron perfil E6 procedían de la población no VIH mientras que los 6 aislamientos con perfil E12 se localizaron en muestras de enfermos VIH, lo mismo que los 6 aislamientos con perfil E16.

Los perfiles de sensibilidad a antifúngicos encontrados entre las muestras orales de las poblaciones VIH y no VIH comparadas se muestran en la Tabla 57. El perfil mayoritario fue F7, representando el 22,2% de los aislamientos orales, seguido de F14 en un 14,3% y de F5

en un 11,1%. Los 7 aislamientos con perfil F5, al igual que los 6 con perfil F6 se encontraron en muestras procedentes de enfermos VIH. Las 6 cepas que mostraron perfil F12 procedían de la población no VIH.

5. ANALISIS ESTADISTICO:

5.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS

La **simplicidad** del método API 20C AUX fue elevada (91,6%), ya que todos los productos y reactivos eran suministrados por el fabricante y tenían una cierta estabilidad, la técnica era sencilla y los tiempos de incubación fueron de 48h., aproximadamente. La técnica del API ZYM mostró el mejor porcentaje de simplicidad, 95%, ya que el resultado se leía en 4h, la técnica era muy fácil y al ser un método comercial los reactivos ya venían preparados. En el método de resistotipado se obtuvo un valor de simplicidad del 80%, porque en este caso la preparación de los compuestos químicos y sus placas tenía cierta complicación y su estabilidad era menor que en los casos anteriores. La simplicidad en el caso del morfotipado I fue del 76,7% porque la preparación de las placas necesitaba hacerse muy cuidadosamente, necesitó un tiempo de incubación más largo y la lectura objetiva no era demasiado fácil, mientras que en el morfotipado II fue del 80% ya que la lectura resultaba más sencilla. En el método AST se obtuvo un valor del 81,6% debido a que necesitaba más tiempo de realización que otros métodos y las placas poseían cierta inestabilidad. En la caracterización por sensibilidad a los agentes antifúngicos la simplicidad fue del 80% debido en parte a que la preparación de las concentraciones de antifúngicos eran laboriosas.

En la Tabla 58 se muestran los valores de simplicidad general asignados a cada uno de los factores considerados.

La **tipabilidad** para los métodos API 20C AUX, perfil enzimático API ZYM, resistotipado, morfotipados I y II y perfil PSA fue de 100% dado que ninguna cepa fue clasificada como "no tipable". El método de morfotipado en AST fue el único que mostró variabilidad en su tipabilidad. La tipabilidad en este método para la mayoría de las especies estudiadas resultó del 100%, pero en el caso de C. glabrata la tipabilidad se redujo al 27,7% porque se encontraron 13 aislamientos de los 18 analizados que no pudieron crecer en agar de Sabouraud con trifeniltetrazolio y se clasificaron como no tipables.

La **reproducibilidad** del método API 20C AUX se fijó entre un 75% para T. beigelii y un 97% para C. tropicalis, suponiendo unas condiciones ideales de ajuste de inóculo y

estandarización del método. Para el sistema API ZYM osciló entre el 70% en C. parapsilosis y el 97% en C. tropicalis. En el método de resistotipado, la reproducibilidad osciló entre un 70% para C. albicans y un 87% para C. tropicalis. En el Morfotipado I osciló entre el 50% en C. albicans y el 80% en C. parapsilosis, mientras que en la técnica de Morfotipado II osciló entre el 92% en T. beigelii y el 100% en C. glabrata. La reproducibilidad de la técnica AST varió entre el 75% para C. parapsilosis y el 93% en C. glabrata y T. beigelii. En el método PSA se valoró entre el 75% para C. parapsilosis y el 87% para C. albicans.

El porcentaje de **discriminación** del sistema API 20C AUX osciló entre el 31% para C. glabrata y el 94% para T. beigelii. En el sistema API ZYM varió desde el 58% en C. glabrata al 92% en T. beigelii. La discriminación de la técnica de resistotipado fue muy buena con márgenes de variación entre el 84% para C. tropicalis y el 90% para C. albicans y T. beigelii. En el caso del morfotipado I varió entre el 0% para C. glabrata y el 90% en T. beigelii, mientras que en el morfotipado II el método varió entre un 3% para C. parapsilosis y el 75% para C. albicans. La discriminación del método AST se calculó entre el 67% en el caso de C. glabrata y el 94% en C. tropicalis. En el perfil de sensibilidad a los antifúngicos se calculó entre el 28% en C. neoformans y el 97% en C. tropicalis. Los porcentajes de operatividad y eficacia asignados a cada una de las especies mayoritarias se reflejan en las Tablas 59-63.

5.2 DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS: DENDROGRAMAS DE SIMILITUD

En C. albicans, el análisis de la distancia entre biotipos según el método API 20C AUX, reunió cepas en un grupo homogéneo, muy próximo taxonómicamente a otros 8 grupos que reunían casi la totalidad de la población. Sólo se encontraron 2 aislamientos a una distancia taxonómica de 5 OTUs respecto al resto de la población, y un aislamiento que mostró una divergencia taxonómica de 25 OTUs frente a las demás. Con el método API ZYM se obtuvo una mayor diversidad ya que se diferenciaron 66 grupos entre las 188 cepas de C. albicans analizadas. De dichos grupos, 164 aislamientos se reunieron en grupos cuya distancia taxonómica era de 10 o menor. A distancia taxonómica de 15 OTUs sólo se discriminaron 2 biotipos. El resistotipado clasificó 25 grupos separados por una distancia taxonómica de 5 OTUs. A distancia de 10 OTUs la población se agrupaba en 7 sectores y a una distancia de 15 OTUs quedaban clasificados en dos grupos que separaban taxonómicamente 10 aislamientos del resto de la población. Según el método AST, los aislamientos de C. albicans estudiados, se clasificaron en 6 grupos, de los cuales 4 poseían distancia taxonómicas inferiores a 5 OTUs. El resto, representados por 5 aislamientos mantenía una distancia taxonómica con los demás superior a 20. El perfil PSA clasificó 32 grupos taxonómicos, que

se reducían a 11 si la distancia taxonómica se aumentaba a 5 OTUs y a sólo 5 grupos si dicha distancia se consideraba 10 OTUs. Hubo 26 aislamientos que mostraron una distancia taxonómica de 20 OTUs frente al resto de los aislamientos de C. albicans.

Los dendrogramas obtenidos para esta especie y los métodos de tipado estudiados se reflejan en las Figuras 1, 2 y 3.

En C. tropicalis el método API 20C AUX clasificó la población en 14 grupos que a una distancia taxonómica de 5 OTUs quedaban reunidos en sólo 3 grupos. Sólo dos aislamientos se separaron del resto una distancia taxonómica de 25 OTUs. Con el API ZYM se encontraron 45 grupos entre las 63 cepas estudiadas. A una distancia taxonómica de 5 OTUs, se apreciaron 17 subpoblaciones, 10 de ellas formados por un sólo aislamiento. A una distancia taxonómica de 10 OTUs se mantenían 11 grupos. Hubo tres aislamientos que se separaron del resto una distancia taxonómica de 25 OTUs del resto de la población. Los dendrogramas de similitud de estos métodos se exponen en las Figuras 4 y 5.

El dendrograma de similitud sugerido por el resistotipado clasificó los aislamientos de C. tropicalis en 21 grupos con una distancia taxonómica entre ellos superior a 5 OTUs. A una distancia taxonómica de 10 OTUs se reunían en 8 grupos y necesitó una distancia taxonómica de 25 OTUs para superar 12 aislamientos del resto de la población. El método AST estableció sólo tres poblaciones, dos de ellas a una distancia taxonómica inferior a 5 OTUs que albergaba todos los aislamientos menos dos, que se diferenciaban del resto en una distancia taxonómica de 25 OTUs. El perfil PSA diferenció 28 grupos entre los 63 aislamientos de C. tropicalis a una distancia taxonómica inferior a 5 OTUs que ampliada a 25 OTUs los reunía en dos únicas poblaciones. Una de ellas reunía 24 aislamientos con distancia taxonómica de hasta 10 OTUs. La otra población reunió el resto que quedaba a su vez clasificado en dos grupos que tenían una distancia taxonómica de 15 OTUs.

En C. parapsilosis la distancia entre biotipos propuesta por el resistotipado diferenciaba claramente dos poblaciones. Una de ellas estaba compuesta por 7 grupos, 6 de ellos unitarios, separados entre ellos por una distancia taxonómica de 15 OTUs. La otra población reunió 6 grupos que albergaban 42 de los 53 aislamientos de C. parapsilosis analizados, separados por distancias taxonómicas que oscilaron entre 5 y más de 20 OTUs. Hubo sólo un aislamiento apartado del resto con una distancia taxonómica de 25 OTUs. El perfil PSA estableció también dos grupos separados por una distancia taxonómica de 25 OTUs. Uno de ellos agrupó la mayoría de los aislamientos, clasificados en 10 grupos, uno de ellos mayoritario que contenía 22 aislamientos. El segundo grupo estuvo formado por 5 aislamientos que mantenían con el resto una distancia taxonómica de 25 OTUs.

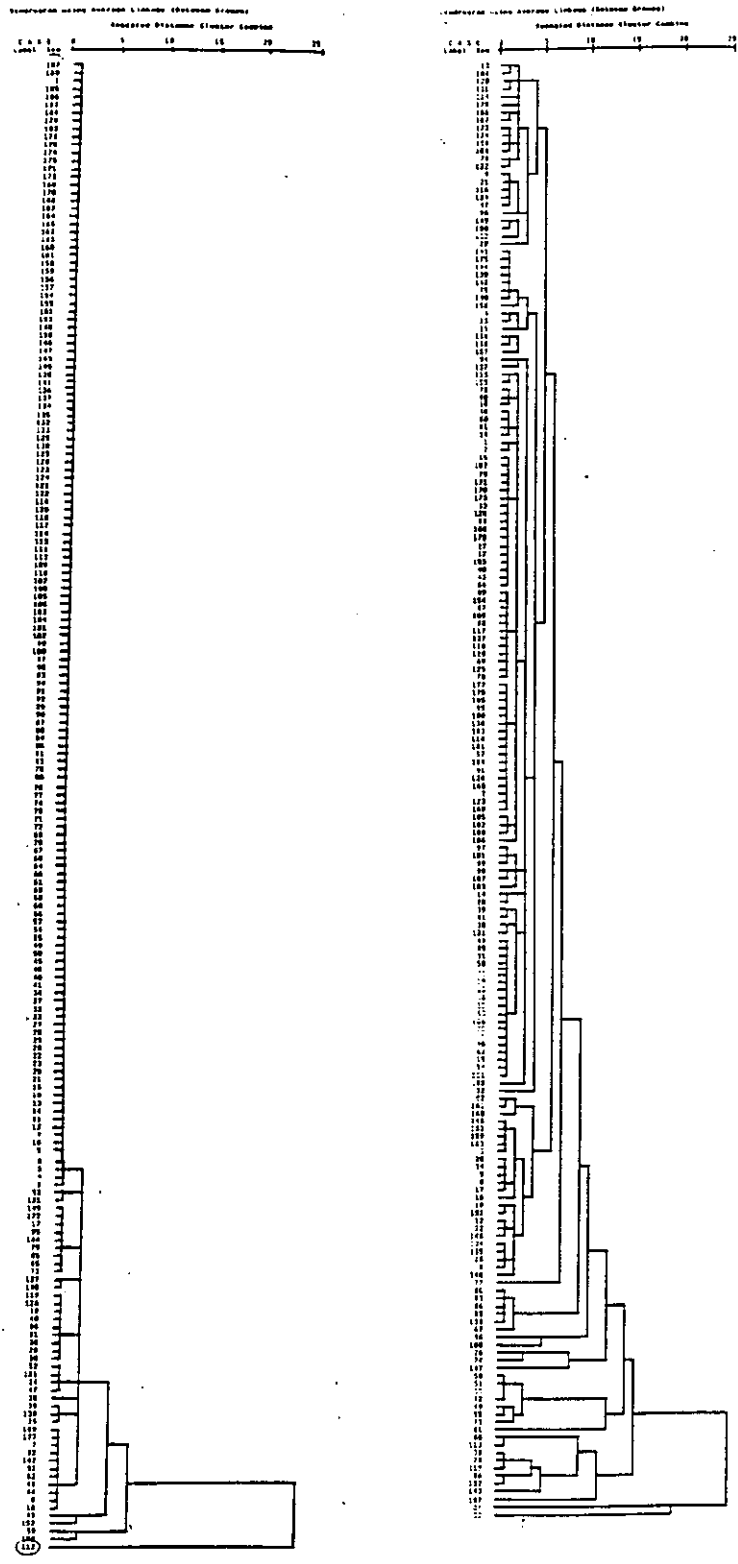


FIGURA 1. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. albicans*: a) según el API 20C, b) según el perfil API ZYM.

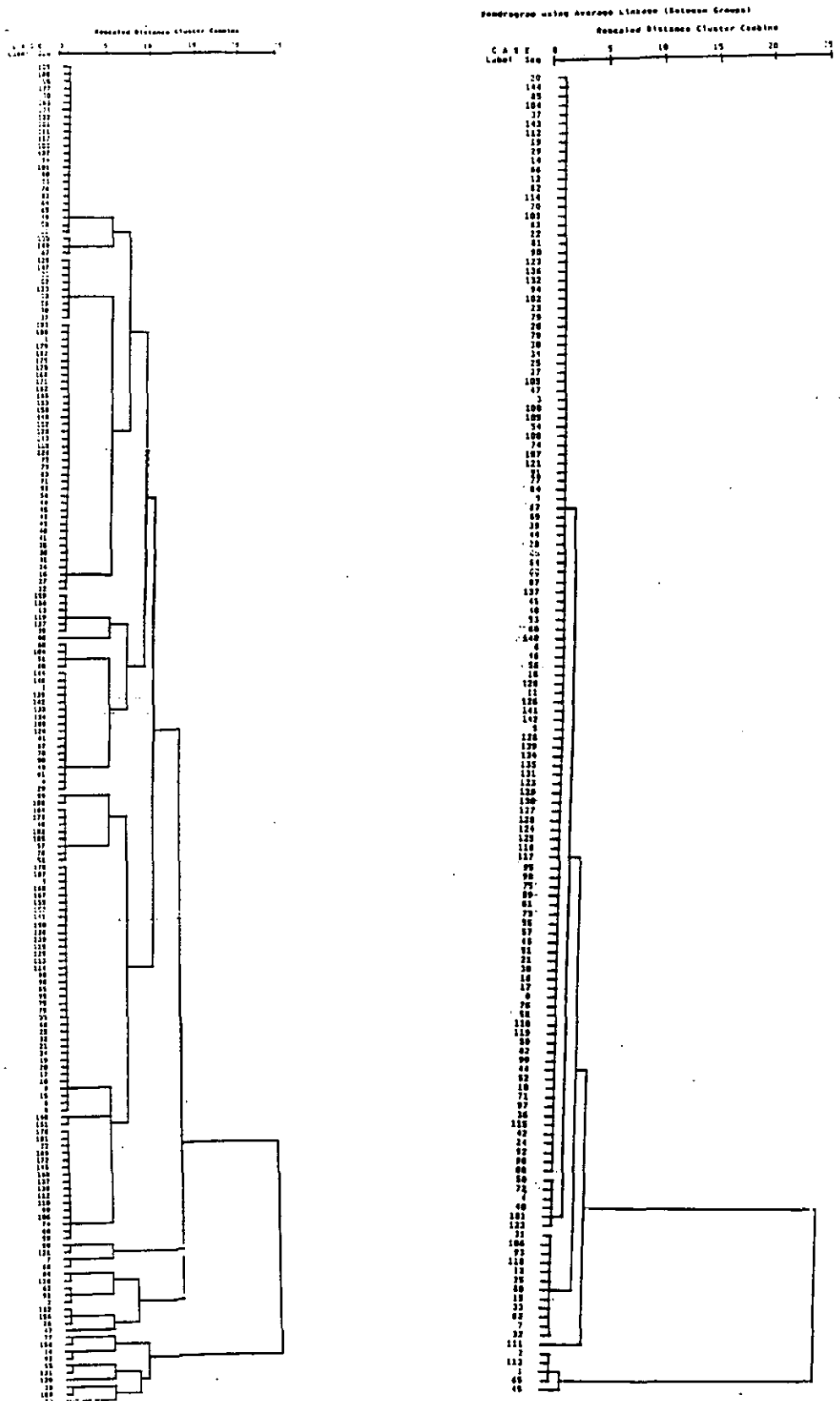


FIGURA 2. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. albicans*: c) según el resistotipado, d) según el método AST.

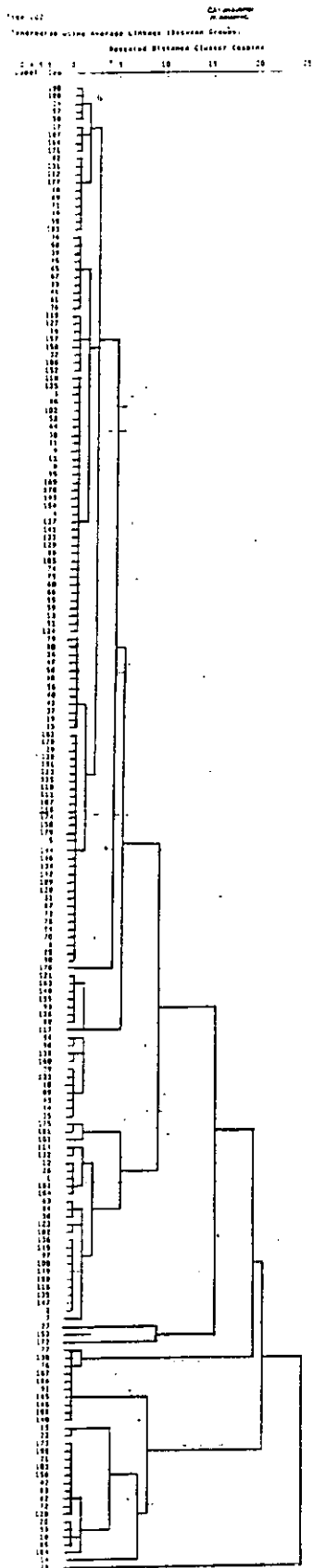


FIGURA 3. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. albicans*: e) según el método AST.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

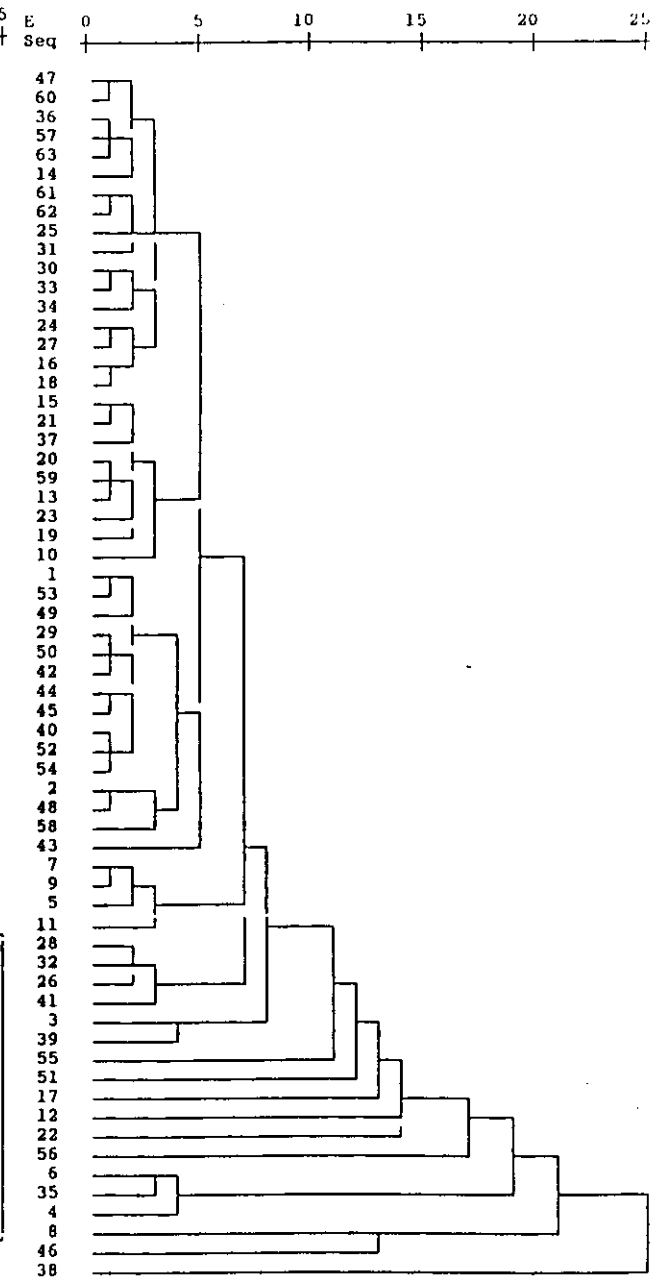
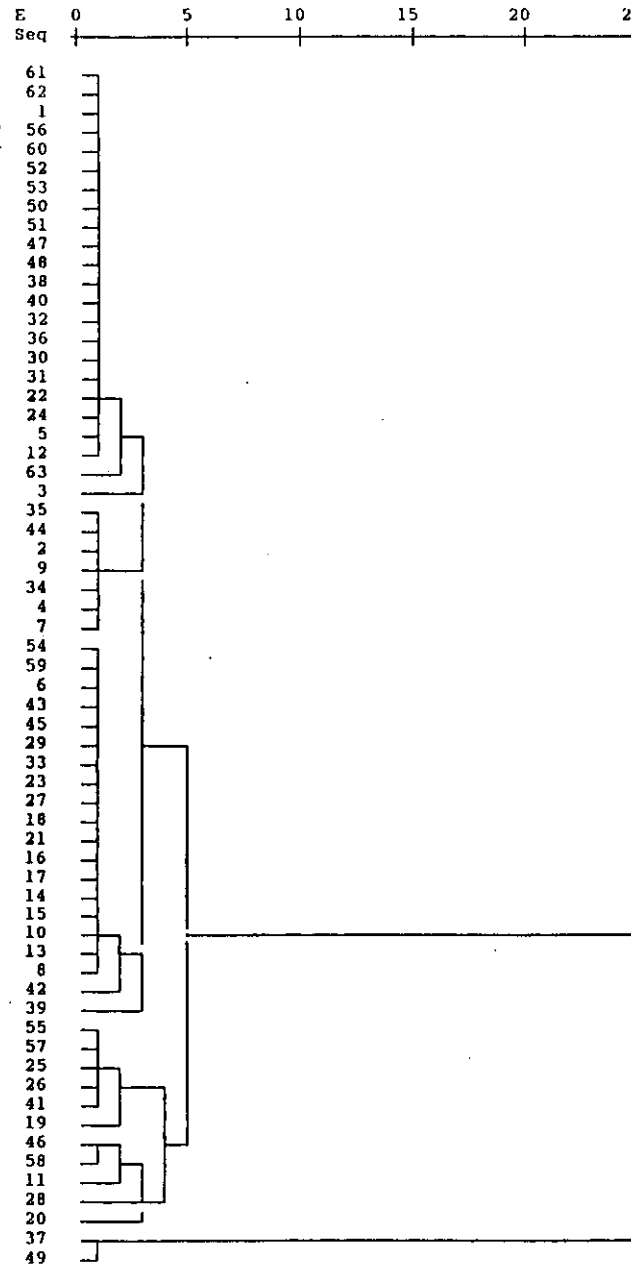
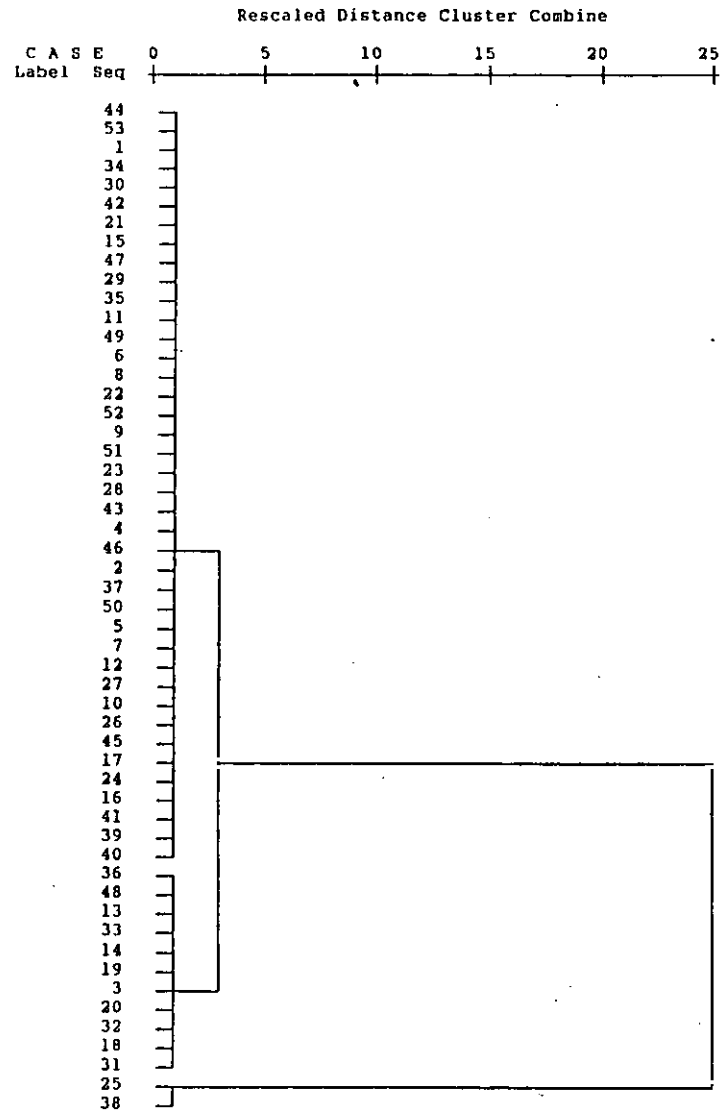
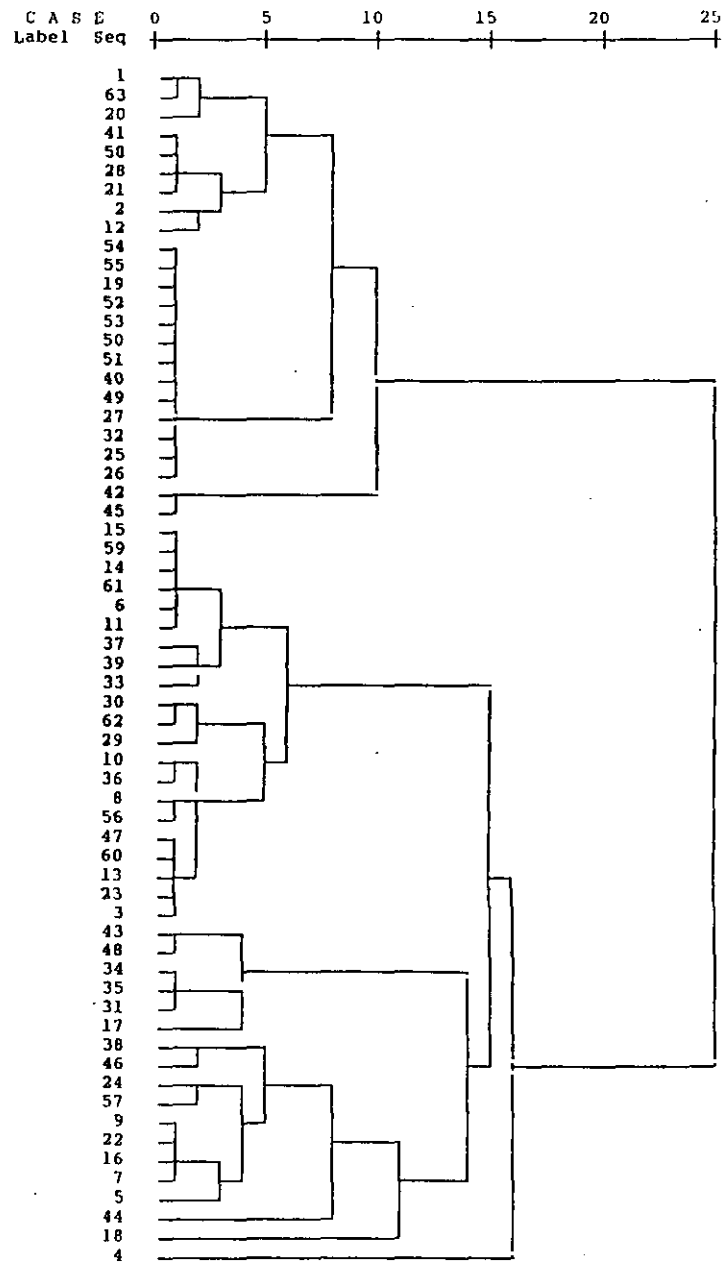
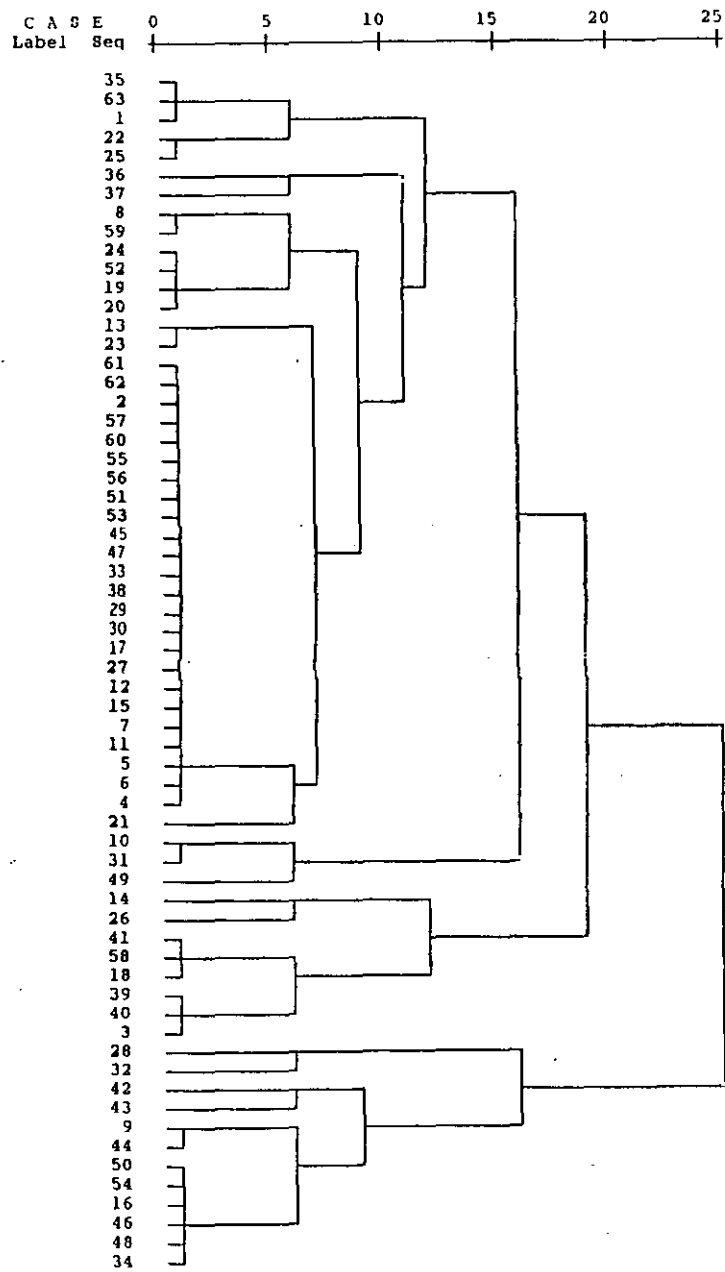


FIGURA 4. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. tropicalis*: a) según el método AST, b) según el perfil API 20C, c) según el perfil



El método AST, así mismo, estableció dos grupos bien diferenciados. El primero reunió 30 aislamientos en 5 grupos cuya distancia taxonómica era de 5 OTUs. El otro grupo reunió el resto de la población en 6 grupos a una distancia también de 5 OTUs. El perfil enzimático marcó una distancia taxonómica de 25 OTUs para un sólo aislamiento de la población de C. parapsilosis estudiada. El resto quedó reunido en 13 grupos cuya distancia taxonómica era de 5 OTUs. En las figuras 6 y 7 se muestran las distancias entre biotipos en C. parapsilosis según los diferentes métodos analizados.

En T. beigeli el método API 20C AUX diferenció un aislamiento del resto de la población a una distancia taxonómica de 25 OTUs. El resto se clasificó en 13 grupos con distancias taxonómicas de casi 20 OTUs. El perfil enzimático diferenció 3 aislamientos del resto quedando el resto formando dos subgrupos y un aislamiento que mantenía una distancia de más de 15 OTUs con dichos subgrupos. El resistotipado clasificó los aislamientos de T. beigeli en 2 grupos. Uno de ellos estaba formado por 10 aislamientos reunidos en 3 grupos con una distancia taxonómica entre ellos de más de 10 OTUs. El resto de la población se repartió en 6 grupos quedando un aislamiento a una distancia taxonómica de 20 OTUs del resto de los aislamientos. El método PSA diferenció 2 aislamientos del resto que se reunió en 10 grupos que mantenían entre sí distancias de hasta 15 OTUs. El método AST marcó una distancia taxonómica de 25 OTUs para uno de los aislamientos de T. beigeli, diferenciándolo del resto de la población, que quedó reunida en 6 grupos con distancia taxonómicas menores de 10 OTUs.

Los dendrogramas de similitud de esta especie para cada uno de los métodos estudiados se representan en la figura 8.

En C. glabrata el API 20C diferenció 3 aislamientos del resto con una distancia taxonómica de 25 OTUs, quedando el resto formando un único grupo a la misma distancia taxonómica. El perfil enzimático clasificó los aislamientos de C. glabrata en 10 grupos, 8 de los cuales guardaban entre sí una distancia taxonómica de 10 OTUs y dos de ellos, que eran unitarios, quedaron a una distancia taxonómica de 20 OTUs. El resistotipado clasificó los aislamientos de C. glabrata en 8 grupos, uno de los cuales reunía 7 aislamientos, que se situaban a una distancia taxonómica entre 5 y 25 OTUs. El método AST reunió 9 aislamientos en un grupo que quedó separado del resto una distancia taxonómica de casi 10 OTUs, los otros 4 grupos restantes se situaron a distancias taxonómicas entre 20 y 25 OTUs. El método PSA clasificó los aislamientos de C. glabrata en 10 grupos que mostraron distancias taxonómicas variables entre 5 y 25 OTUs. Los dendrogramas para esta especie se representan en la figura 9.

rogram using Average Linkage (Between Groups)

Rescaled Distance Cluster Combine

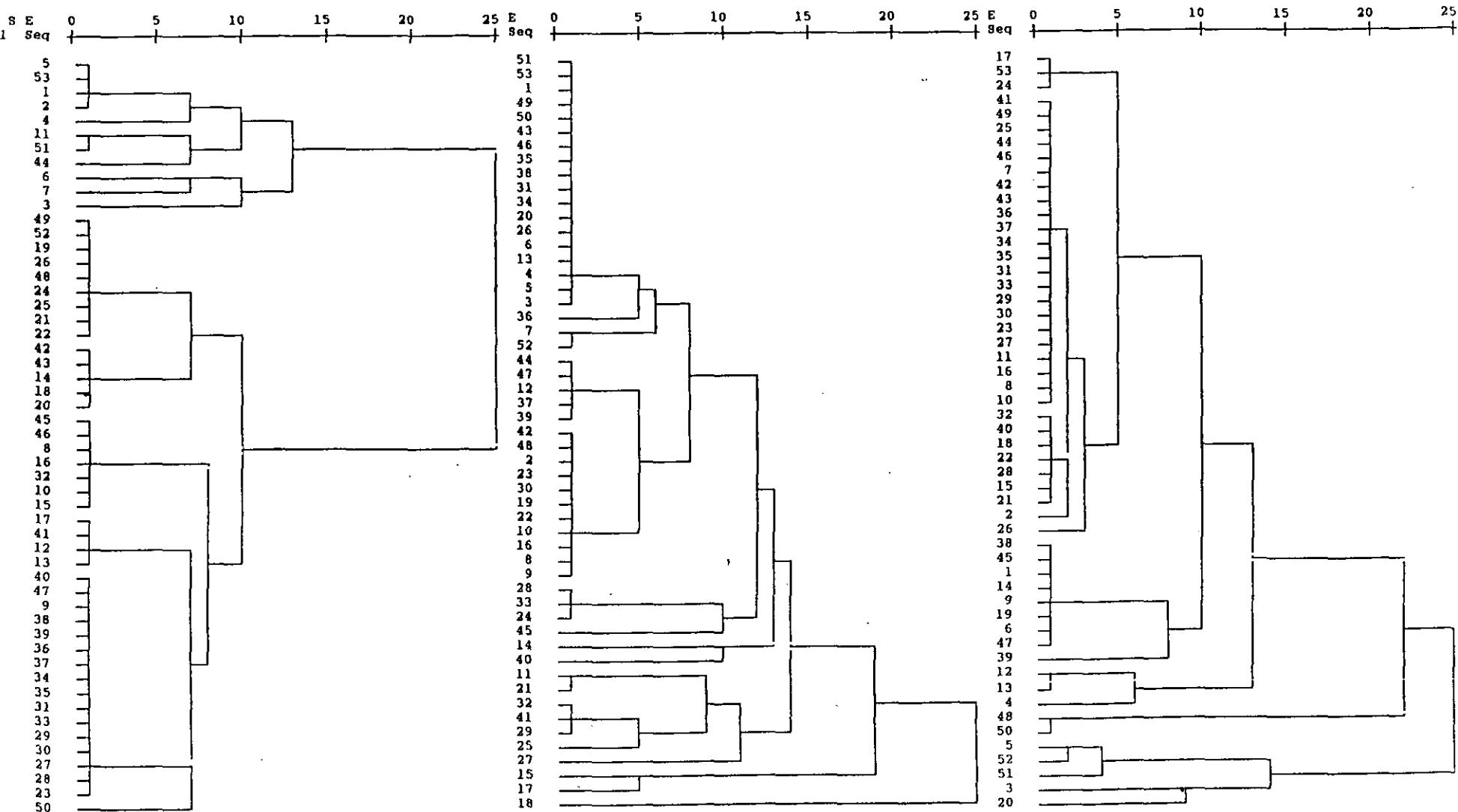


FIGURA 6. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. parapsilosis*: a) según el resistotipado, b) según el método API ZYM, c) según el método PSA.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

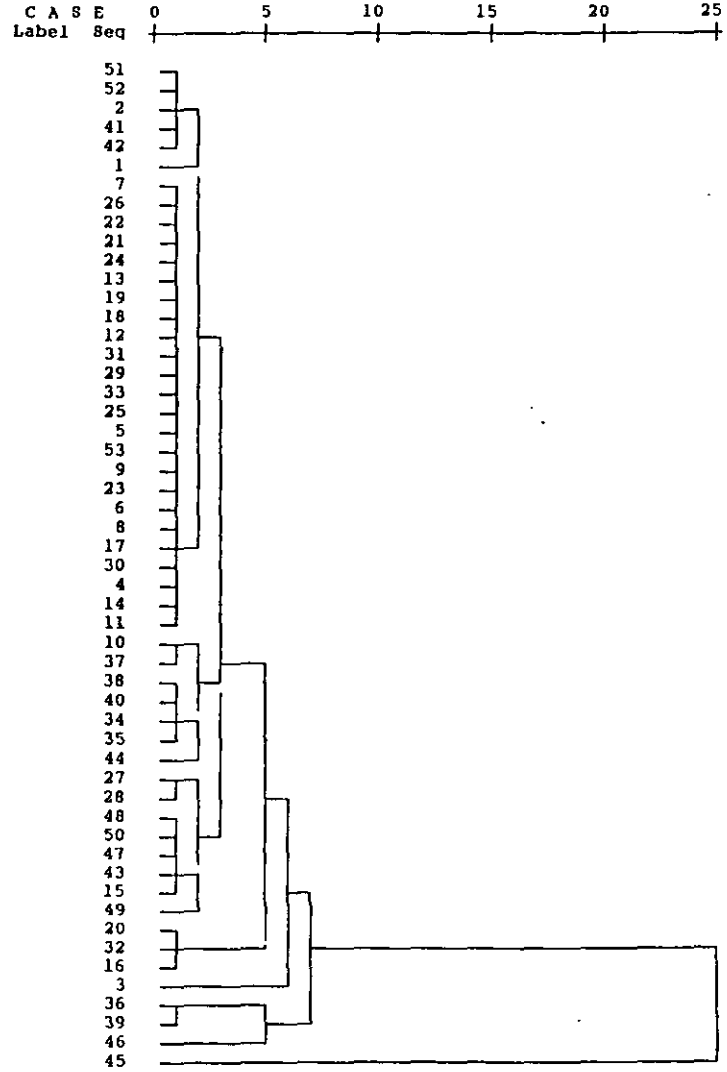
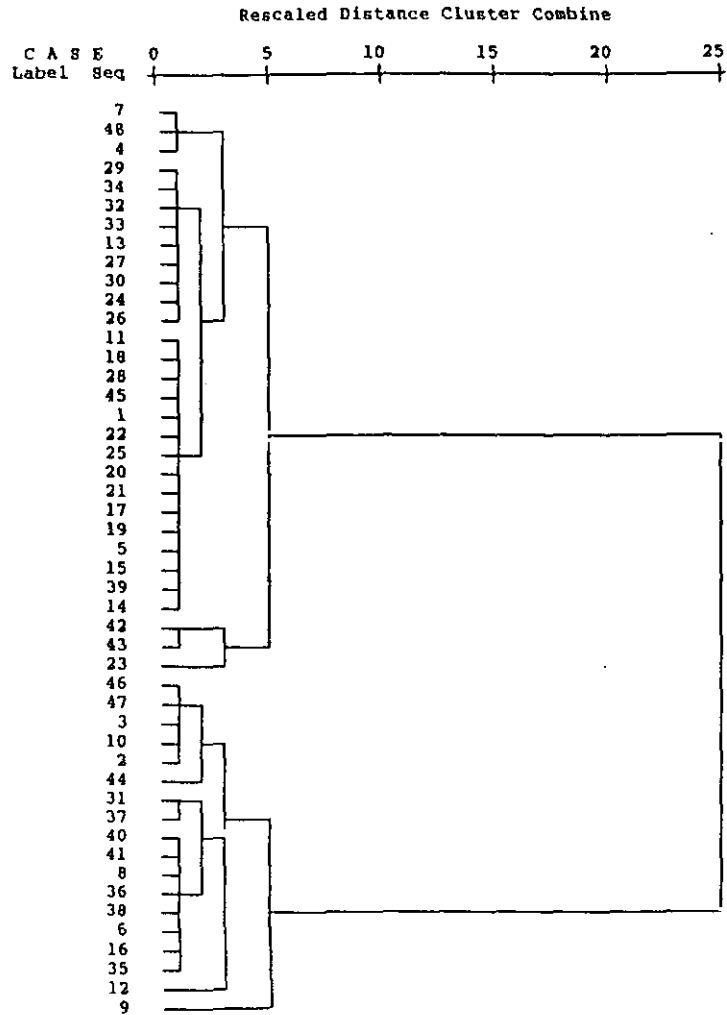


FIGURA 7. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *C. parapsilosis*: d) según el método AST, e) según el perfil API 20C.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

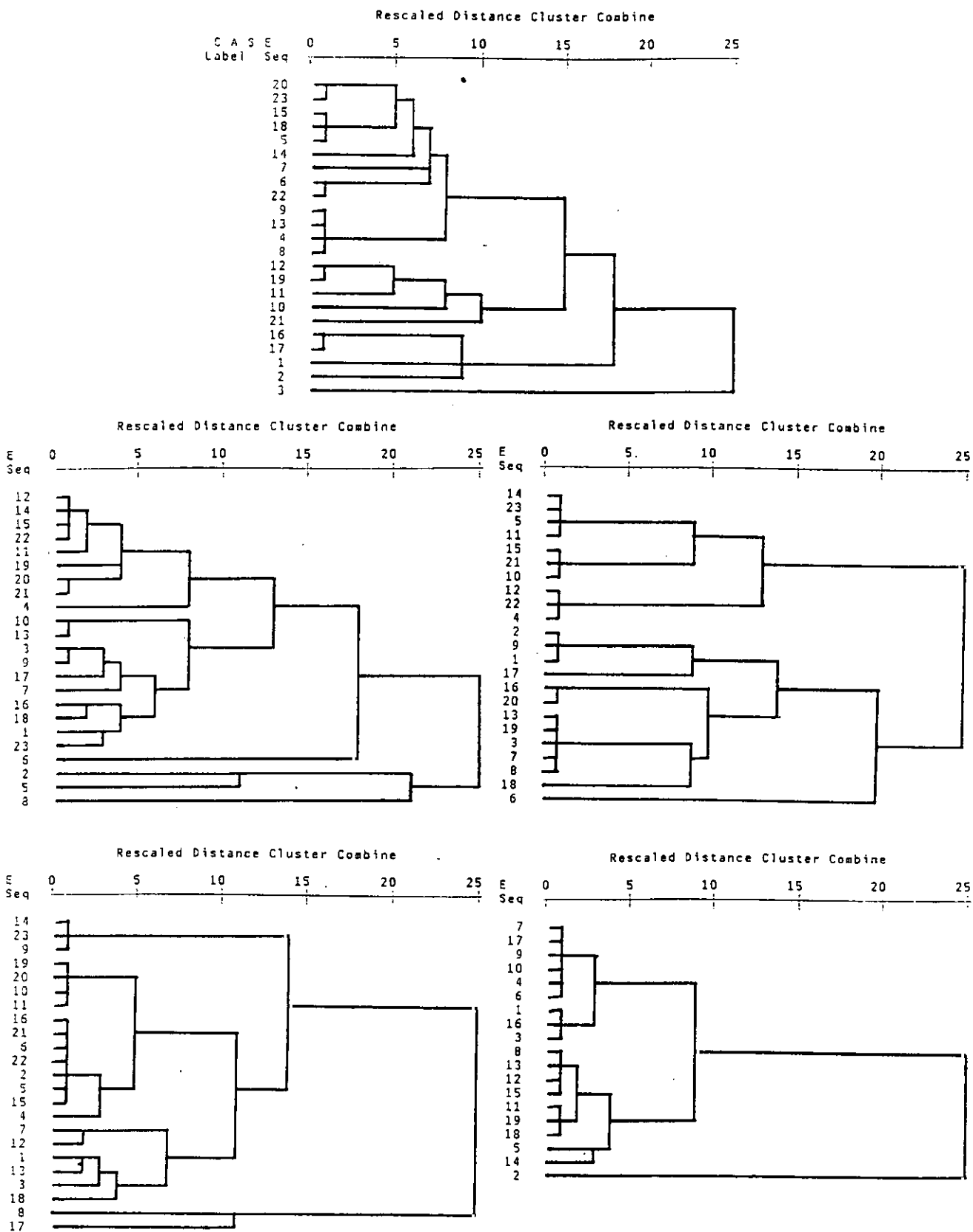
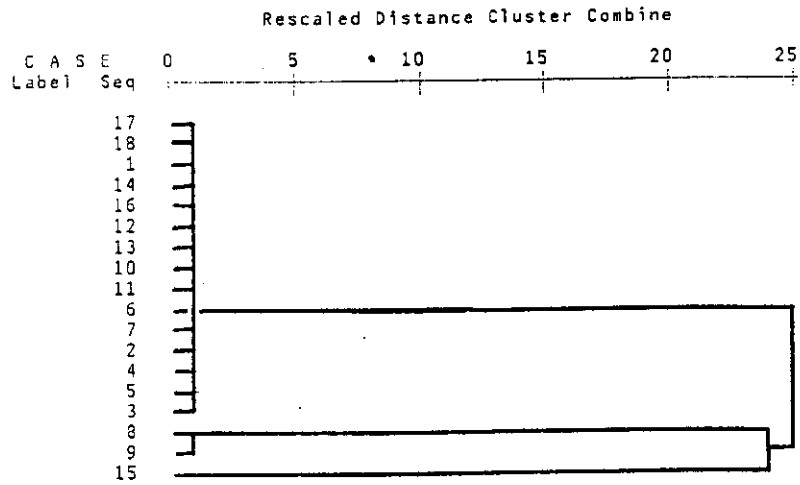
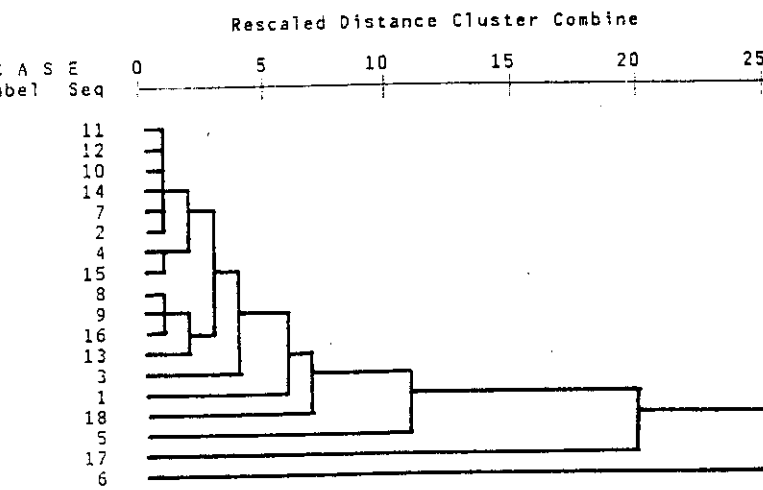


FIGURA 8. DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS EN *T. beigellii*: a) según el perfil API 20C, b) según el perfil API ZYM, c) según el resistotipado, d) según el método PSA, e) según el método AST.

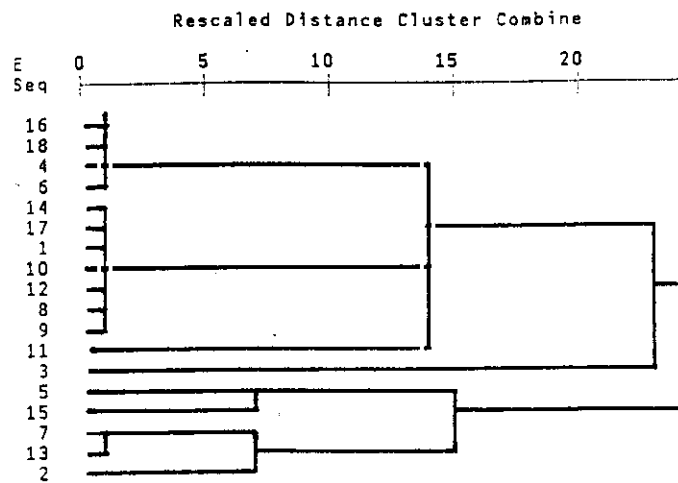
Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



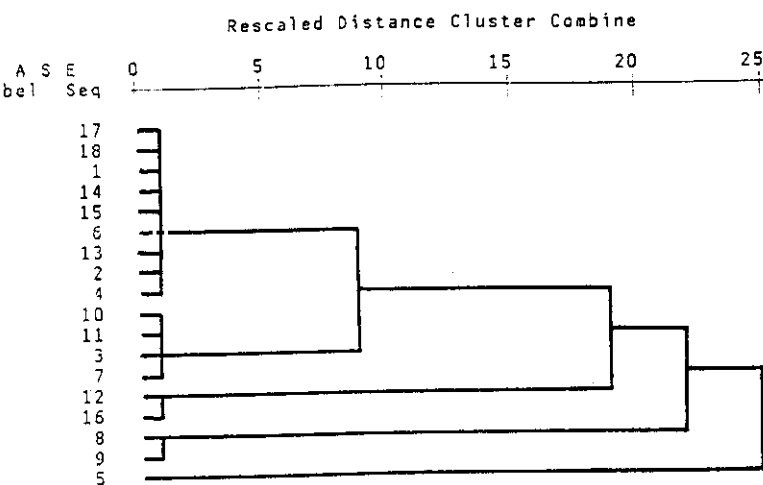
Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

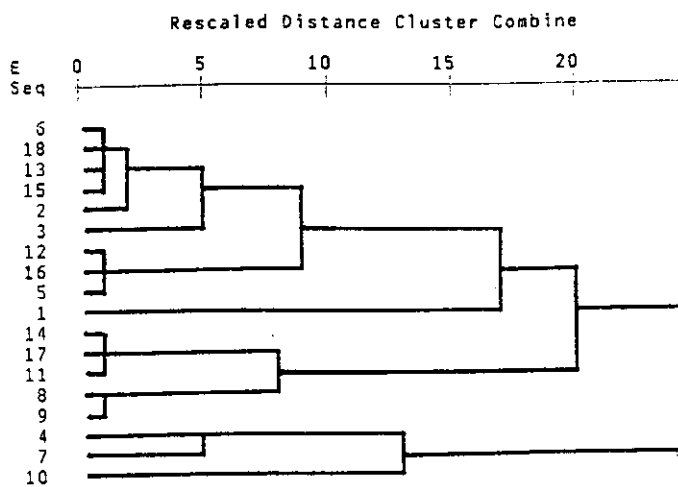


FIGURA 9. DISTANCIA ENTRE BIOTIPO EN *C. glabrata*: a) según el API 20C, b) según el perfil API ZYM, c) según el resistotipado, d) según el método AST, e) según el perfil PSA.

En la tabla 65 vienen reflejados los grupos identificados por cada dendrograma a una distancia de 5 y de 10 OTUs, según cada método de tipado.

5.3 RELACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS

A.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIAS ENTRE EL METODO API 20C AUX Y EL PERFIL ENZIMATICO.

El análisis de correspondencias entre todas las parejas posibles establecidas entre estos dos métodos nos dio un porcentaje de varianza explicada que osciló entre 0,53 y 0,58 para C. albicans y C. tropicalis. En el caso de T. beigelii fue de 0,24 lo cual indicó que la tabla de dos dimensiones cualitativas donde estaría reflejada la información de todas las parejas posibles entre el API 20C AUX y el perfil enzimático, no se ajustó bien a la representación en un plano bidimensional. En C. glabrata el porcentaje de inercia explicada fue de 1 lo que indicó que los datos de todas las parejas quedaban perfectamente representados en el plano bidimensional sin ninguna pérdida de información; sin embargo no se pudieron establecer correspondencias entre las distintas parejas formadas entre los dos métodos. En el caso de C. albicans todas las parejas quedaron próximas en un sector del espacio de forma que no fue posible establecer relaciones entre ellas, al menos en las dos dimensiones del plano estudiadas. Los biotipos 2776174,6576174 y 6776174 quedaron alejados de dicho conjunto.

B.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE LOS BIOTIPOS API 20C AUX Y EL RESISTOTIPADO.

El análisis de correspondencia entre el API 20C AUX y el resistotipado nos dio unos porcentajes de varianza explicada que oscilaron entre 0,41-0,47 para C. tropicalis, T. beigelii y C. parapsilosis, 0,54 para C. albicans y 0,67 para C. glabrata. En el caso de C. albicans parece que el análisis de correspondencia entre las parejas de los dos métodos reveló cierta correspondencia entre las parejas 2174174-OOOBKOO y 2556174-OCOBKKL. El resto de las parejas se encontraron formando un conjunto en un sector delimitado del espacio sin que pudieran definirse sus correspondencias, al menos en las dos dimensiones del espacio consideradas. En C. tropicalis tomando el plano bidimensional como referencia se encontraron tres parejas que mostraron correspondencia: 2556175-OOOOKOL, 6756135-OOOOKKL y 2576175-OCFBKKL. El resto se dispuso formando un grupo muy próximo en

el espacio que no permitía establecer ninguna correspondencia en las dos dimensiones analizadas. En C. parapsilosis se encontró correspondencia entre 6746175-6752135-0000000, 2742175-OCFBKKL, 6756175-OCOBKKL y 2746174-OCOOKOL. El resto de parejas se distribuyeron en el plano sin que fuera posible establecer relaciones entre ellas. En T. beigelii se estableció relación entre las parejas 6745775-000B000, 2744775-OOFBOOL, 6757775-6767774-0000000, 2765737-OCFO000. El resto se distribuyó al azar en un sector del plano siendo imposible encontrar alguna correspondencia en dos grados de inercia. En el caso de C. glabrata se encontraron dos parejas que guardaban correspondencia, 6000040-OOFOOOL situada en un extremo del plano y 2000100-UCOBKKL en otro extremo del plano. El resto se situó próximo en una región del plano bidimensional sin guardar correspondencia, al menos en el corte del plano analizado.

La representación gráfica de las correspondencias establecidas entre el API 20C AUX y el resistotipado, en C. glabrata, en el plano bidimensional se muestra en la figura 10.

C.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE LOS BIOTIPOS API 20C Y EL MORFOTIPADO.

El análisis de correspondencias entre estos dos métodos nos indicó unos valores muy buenos de porcentaje de varianza explicada. En C. albicans dicho porcentaje de inercia fue de 0,74. Se encontraron correspondencia entre los morfotipos sin borde y los biotipos 2172174, 2174174, 2556174 y 2566174. El resto del conjunto se situó en un mismo sector del plano sin que pudieran apreciarse sus posibles correspondencias. En el caso de C. tropicalis se encontró un porcentaje de varianza explicada de 0,95 lo cual indicaba que la información de todas las parejas de resultados cualitativos entre los dos métodos, se ajustaban muy bien al plano bidimensional sin que existiera pérdida de información. En esta especie se encontró relación entre los morfotipos sin borde y 2556075, 6756135, también entre los morfotipos BEF y 2556175, y entre los morfotipos BAF y BAG con el resto de los biotipos API 20C. En C. parapsilosis como era de esperar se encontró correspondencia, con un coeficiente de varianza explicada de uno, entre los morfotipos sin borde y todos los biotipos API 20C. En T. beigelii el porcentaje de inercia explicado fue de uno, lo cual indicó correspondencia entre las parejas BAG-2545775-2740775, BD-6747774. El resto se situó próximo en el plano de análisis. El análisis de correspondencia en C. glabrata indicó independencia entre las parejas analizadas.

La representación gráfica del análisis de correspondencias establecidas entre estos dos métodos, en C. tropicalis, en el plano bidimensional se muestra en la figura 11.

D.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE LOS BIOTIPOS API 20C Y EL PSA.

El análisis de correspondencias entre los biotipos API 20C AUX y los perfiles de sensibilidad antifúngica indicaron porcentajes de varianza explicada de 0,61-0,62 para C. albicans y C. parapsilosis, de 0,39 y 0,41 para T. beigelii y C. tropicalis y de 0,89 para C. glabrata. En C. albicans se encontró relación entre 2174174-F13 y entre 2566174-2172174-2556174-F2-F8. En C. tropicalis se observó correspondencia entre 6556175-F26, 2576175-2546175-F12-F35, 2556375-F31 y 2556177-F2. En C. parapsilosis hubo correspondencia entre 6756135-F5, 6752135-F38 y 2756175-F34. En el caso de T. beigelii se encontró cierta relación entre las parejas 2744775-F4, 2744774-F5 y 2765737-F25. En C. glabrata, que mostró el mejor porcentaje de inercia explicada, se encontraron correspondencias entre 2000100-F44 situados en un extremo del plano, 2000041-F47 situados en el mismo lado del plano pero en el otro extremo, y 6000040-F45 que se situaron al otro lado del plano respecto a las parejas anteriores. El resto se agrupó en otro sector del plano sin que pudieran establecerse correspondencias entre las parejas que lo componían.

E.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE LOS BIOTIPOS API 20C Y LOS MORFOTIPOS AST

En C. albicans el porcentaje de varianza explicado fue de 0,55 lo que indicó que los datos cualitativos correspondientes a cada una de las parejas posibles entre los dos métodos comparados, se ajustaba sólo a medias al plano de representación, de forma que parejas que aparentemente estuvieran muy próximas en el plano, si se vieran desde otra dimensión podrían estar muy alejadas. En conjunto no se encontró mucha correspondencia entre las parejas estudiadas. Parecía existir relación entre 2174174-RRNS y entre 2566174-RRNN. La pareja 2556174-LVSS se encontraba muy alejada en el plano del resto de las parejas. En C. tropicalis se encontró un coeficiente de varianza de 0,72, observándose relación entre las parejas, 254675-LRSS, 2556375 y 2556175 con RRNN y LVSN, 6757175-2556175-LVBSS. En C. parapsilosis, el porcentaje de varianza explicado fue de 0,62. Se encontró correspondencia entre 6652175-RRSN y 6746175-RVBSS encontrándose ambas en sectores alejados del plano respecto al grupo principal donde se encontraba el resto de parejas reunidas sin posible conexión entre ellas. En T. beigelii se encontró un porcentaje de inercia explicada de 1. Estudiando el plano bidimensional se encontraron correspondencias para las parejas RRSS-2744774-2744775, RRNS-2745737 y el resto de parejas que coincidieron en un mismo punto del plano. En el caso C. glabrata se encontró un coeficiente de varianza de 1 utilizando una sola dimensión, sin embargo sólo se encontró correspondencia con la pareja RRNN-

2000041. El resto quedaba reunido en el centro de la dimensión formando un grupo homogéneo donde no se podían establecer correspondencias.

F.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL PERFIL ENZIMATICO Y EL RESISTOTIPADO

El análisis de correspondencias entre estos métodos no reveló un buen coeficiente de varianza para ninguna de las especies analizadas, dando valores que oscilaron entre 0,39 y 0,51. C. glabrata fue la única especie que mostró un porcentaje de varianza aceptable, de 0,72. En C. albicans se encontró una pareja con relación, E13-OCOBKKL. En C. tropicalis se estableció cierta correspondencia entre E11-OOOOKOL-OOOOKKL-OOOBKKL y entre E6 y OCFBOOO-OOOBKOO. En C. parapsilosis se encontró correspondencia entre E11-OCOBKKO y E27-OCOBKOOL. En T. beigeli se encontró una cierta relación entre E51-OCFOOOO, OOOB000 con E36, E34, E45, E43 y OOOOOOO con E48, E47, E21 y E50. En C. glabrata hubo correspondencia entre E3-OOOB00L, E28-OOOBKKL y E40-OOOBKKO.

G.- ANALISIS CORRESPONDENCIA ENTRE EL PERFIL ENZIMATICO Y EL MORFOTIPADO

En C. albicans no se encontró un buen grado de correspondencia ya que el porcentaje de varianza explicada fue de 0,57, sin embargo se encontró cierta relación entre los morfotipos BD y los perfiles E18, E21 y E4, entre los morfotipos SB y E3, E6, E14 y E2 y entre los morfotipos BEG y los perfiles E15-E11. En C. tropicalis se encontró buena correspondencia (porcentaje de inercia de 0.84) entre BEG-E31, SB-BD-E11 y el resto quedaron próximos en un área del plano. En C. parapsilosis el porcentaje de varianza explicada fue de 1 utilizando una sola dimensión, lo que indicó que las parejas posibles se ajustaban perfectamente a una sola dimensión sin pérdida de información. Se encontraron correspondencias entre las parejas BEF-E21, situada en un extremo de la dimensión y SB con el resto de perfiles posibles en el otro extremo. En T. beigeli hubo también un uno de correspondencia entre BD-E45-E34, BAF con los perfiles E47, E48, E49, E50, E51, E36, E19, E23, E42 y E43, quedando el resto de perfiles enzimáticos relacionados con BEG y BEF. En C. glabrata no se encontró correspondencia entre las parejas de datos analizados.

H.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL PERFIL ENZIMATICO Y EL PERFIL DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS.

El análisis de correspondencias en C. albicans analizado a dos dimensiones sólo explicaba un 0.37 de la diversidad. Se observó un grupo formado por F3-F5-F12 relacionado con E2-E3-E4-E17-E18-E21 y otro grupo que albergaba el resto de las parejas distribuidas de forma difusa. En C. tropicalis el porcentaje de varianza fue de tan sólo 0,37. Pareció existir cierta correspondencia entre las parejas F29-E38 y F37-E39 quedando el resto de las parejas dispersas en el plano formando un grupo bastante delimitado. En C. parapsilosis el porcentaje de varianza explicado fue de 0,5, se encontraron 2 parejas con correspondencia, F13-E27 y F47-E21 quedando el resto próximas entre sí, en un sector del plano bidimensional alejado de las otras dos parejas. En T. beigelii mostró un coeficiente de varianza explicada de 0,5 y se observó cierta correspondencia entre F39-E42, F4-F5-E46, F38-E50, F25-E51 y F40-E19-E36, quedando el resto formando un sector aparte en el plano. En C. glabrata se encontró una fuerte correspondencia (0.93 de varianza explicada) entre F2-E28, situándose el resto de las parejas estudiadas dispersas en el plano formando un sólo grupo bastante homogéneo.

I.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL PERFIL ENZIMATICO Y LOS MORFOTIPOS AST.

En C. albicans las dos dimensiones del plano analizado explicaron un 0.57 de la diversidad existente entre las parejas analizadas (porcentaje de varianza). Se encontraron ciertas correspondencias entre F7-LVBSS y entre F3-RVNN, quedando el resto formando un grupo difuso que no permitía establecer correspondencia. En C. tropicalis mostró un coeficiente de varianza explicada de 0,63. Las parejas estudiadas se situaron ocupando tres extremos del plano analizado. Uno con la pareja E29-RVSS, otro con E20 solitario y otro extremo con el resto de las parejas reunidas. En C. parapsilosis el porcentaje de varianza fue de 0,54 y se encontró cierta correspondencia entre las parejas LVSNN-LVNN-E28, LRNN-E27 y RVSNN-RVBSN-E24, quedando el resto de los datos reunidos en tres sectores muy próximos. Para T. beigelii, con un porcentaje de varianza explicada de 0,54, el análisis de correspondencias desveló cierta relación entre E44-RRSS-RVSS, entre E45-E48-RVNS-RRNS, entre E36-E43-E47-LRNN-LRNS y entre LRSS, RRSN, RRNN, RNNN con el resto de los perfiles enzimáticos. C. glabrata mostró un índice de varianza de 1 utilizando una única dimensión, distribuyendo las parejas RBNN-E38 y RRNN-E28 en un extremo de dicha dimensión y LRNN con el resto de los perfiles en el otro extremo.

La representación gráfica del análisis de correspondencias entre el perfil enzimático y el morfotipado AST, para C. parapsilosis y T. beigelii se detallan en las figuras 12 y 13.

J.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL MORFOTIPADO Y EL PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA.

En C. albicans el coeficiente de varianza explicada fue de 0,67. Las parejas posibles se situaron formando un grupo difuso en el plano bidimensional de difícil interpretación, sin embargo se encontró cierta relación entre el morfotipo BEF y los perfiles F16, F19, F8, F11, F15, F43 y el morfotipo BAF se situó próximo a los perfiles F1, F6, F7, F12, F18. Los perfiles F42 y F45 quedaron aislados del resto en un sector y F9, F10, y F20 lo hicieron en otro sector. En C. tropicalis las dos dimensiones del espacio explicaron el 85% de varianza, encontrando relación entre SB-F1, BAG-F31 que se situaron próximos a dos grupos bien definidos que incluían los morfotipos BD y BEG en uno y BD y BAF en otro sector. En el otro extremo del plano se situaron las parejas BEF-F5-F36. En el caso de T. beigelii las dos dimensiones del plano explicaron el 100% de la varianza, mostrando relación entre BAG-F2-F4, y otro grupo con el resto. El análisis de correspondencia para C. glabrata indicó que las parejas se comportaban con independencia.

K.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL MORFOTIPADO Y EL PERFIL EN AST.

Para C. albicans el plano solo explicó el 58% de la varianza, quedando todas las parejas estudiadas reunidas en una cuarta parte del plano. Hubo cierta relación entre BD con LRSN, RRSS y RRNN entre BD con LVNS, LRNN, LRNS y LRSS, entre BEG-RBNN entre SB-RMNS y el resto muy próximos entre sí. En C. tropicalis el índice de correspondencia fue del 0.88 encontrando correspondencia entre LVNN-BD, SB y BAF con RRNS, LVSN, RRNN y RMNS y el resto de parejas AST con BEG y BD.

T. beigelii y C. glabrata se mostraron independientes. C. parapsilosis mostró un coeficiente de varianza explicado de 1 utilizando sólo una dimensión. En un extremo de dicha dimensión se situó la pareja RRSS-BEF y en el otro extremo de la dimensión, el resto de las parejas posibles.

La representación gráfica del análisis de correspondencias establecido entre el morfotipado II y el morfotipado AST, para C. tropicalis se detalla en la figura 14.

M.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL RESISTOTIPADO Y EL MORFOTIPADO

El análisis de correspondencia consideró independientes las parejas de resistotipo-morfotipo de *C. glabrata* estudiadas. Para *T. beigeli* en dos dimensiones pudo explicarse el 100% de la diversidad encontrándose correspondencia entre BD-OOFBOOL, el morfotipo BAF y las parejas OCFOOOO, OCFBOOL, OOBOOL, OOOOOO y OOFOOOL; y entre BAG y UCFBOOL, OCFBOOO y OOFBOOL. En *C. tropicalis* el porcentaje de varianza explicada fue de 0,57, encontrándose cierta correspondencia entre BEG-OCOBKOOI, BAG-OCFBOOO y SB con los resistotipos OOOOKKL, OCFBKKL, OOOOKOL, OCOBKKL y OCOBOOL. En *C. parapsilosis* el porcentaje de varianza en una sola dimensión fue de 1, lo que significaba que una sola dimensión era capaz de representar la correspondencia existente entre las parejas analizadas. Se encontró una fuerte correspondencias entre BEF-OCOBKKO, quedando en el otro sector extremo de la dimensión el resto de parejas posibles. Para *C. albicans* el porcentaje de varianza explicado fue de 0,61, se encontró correspondencia entre BEG-OCOBKOO y SB-OCOOKOL. En otro sector del plano existía correspondencia entre BAG y BD con OCOOOOO, OOOOOOO, OCOBOOL, OCFBKOO, OCFBKKO.

N.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL RESISTOTIPADO Y EL PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA.

En *C. glabrata* encontramos una fuerte correspondencia entre F11-OOFOOOL, situándose el resto de parejas estudiadas dispersas en el espacio formando un sólo grupo, sin embargo el porcentaje de varianza fue de 0,48 lo que indicaría que si estudiáramos dichas parejas desde una dimensión diferente, las parejas que aparentemente se encontraban próximas podrían estar muy alejadas. En *T. beigeli* también se encontró un porcentaje de varianza explicada de 0,48 y se encontraron correspondencias entre F7-F38-OOOBOOL, F25-OCFOOOO y F4-OOFBOOL. En *C. parapsilosis*, que mostró un coeficiente de varianza de 0,43, se encontraron dos parejas relacionadas F13-OCOBKOL y F42-OOOOOOL, situándose el resto de las parejas separadas en el plano por diferir en sus características aunque se distribuyen en una misma región del plano. En *C. albicans* se observó un porcentaje de varianza explicada de 0,40, encontrándose correspondencias entre F22-OCFBKKL, quedando el resto agrupado en una región del plano sin suficiente dimensiones que expliquen su parecido. *C. tropicalis* mostró un porcentaje de varianza explicada de 0,24 y se observó correspondencia en la pareja F34-OCOBKOO. Para el resto de las parejas estudiadas no se pudo explicar la correspondencia en sólo dos dimensiones situándose de forma difusa en el

plano.

La representación gráfica del análisis de correspondencias establecido entre el resistotipado y el perfil PSA, para C. albicans se detalla en la figura 15.

L.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE AST Y EL RESISTOTIPADO

El análisis de correspondencias en C. albicans nos indicó un porcentaje de varianza explicada de 0,46. No se consiguió mucha información porque las parejas quedaron muy juntas en el plano. Se observó alguna relación entre LVSS-OCOBKKL. En C. tropicalis el coeficiente de varianza fue de 0,53 y se encontró cierta correspondencia entre las parejas LRSS y OCFBOOO-OOGBKOO y entre LVNN con OOBKKL, OOOOKOL, OOOOKKL. En C. parapsilosis, con un porcentaje de varianza explicada de 0,52, se encontraron tres grupos bien definidos, RVSN-OCOBKOL, RRSS-OCOBKKO, y el resto coincidiendo en un punto del plano por lo que con sólo dos dimensiones se obtuvo poca información de la diversidad. En T. beigeli el análisis de correspondencias indicó un coeficiente de varianza de 1 explicado tomando sólo un factor, lo que significó que una sola dimensión podía explicar la relación entre las distintas parejas posibles. En un extremo de dicha dimensión se situaron las parejas RRSS-RVSS-RRNS-OOOOOOOO-OOOBOOL. hacia el centro se situaron la mayoría de las parejas formando un grupo homogéneo imposible de discernir correspondencias. En el otro extremo de la dimensión quedó la pareja RRNS-OCFBOOO. En C. glabrata se encontró un coeficiente de varianza de 1 para las dos dimensiones consideradas. Se observaron correspondencias entre RRNN-OOGBKOO y en el extremo opuesto RBNN-OOBKKL, quedando el resto de las parejas reunidas en un mismo sector del plano bidimensional sin que pudieran establecerse más correspondencias.

La representación gráfica del análisis de correspondencias establecido entre el resistotipado y el perfil AST, para T. beigeli, explicado con un sólo factor, se detalla en la figura 16.

O.- ANALISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE EL PERFIL AST Y EL PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA.

Los coeficientes de varianza entre ambos métodos oscilaron entre 0 para T. beigeli, 0,34 en C. albicans, 0,63 para C. tropicalis y 1 en el caso de C. glabrata. En C. albicans se

encontró cierta correspondencia entre LVNS-F11. En C. parapsilosis hubo correspondencias entre RRSS-F47 y RVSN-F13. En C. tropicalis entre LVNN-LRSS-F1 situados en un extremo y LVBSS-F12-F11, LVSN-F2-F4-F13. T. beigelii demostró independencia entre las parejas analizadas. En C. glabrata las dos dimensiones del plano explicaron el 100% de la varianza. Se encontraron correspondencias entre RBNN-F2, RRNN-F3-F5, quedando el resto junto en otro sector del plano.

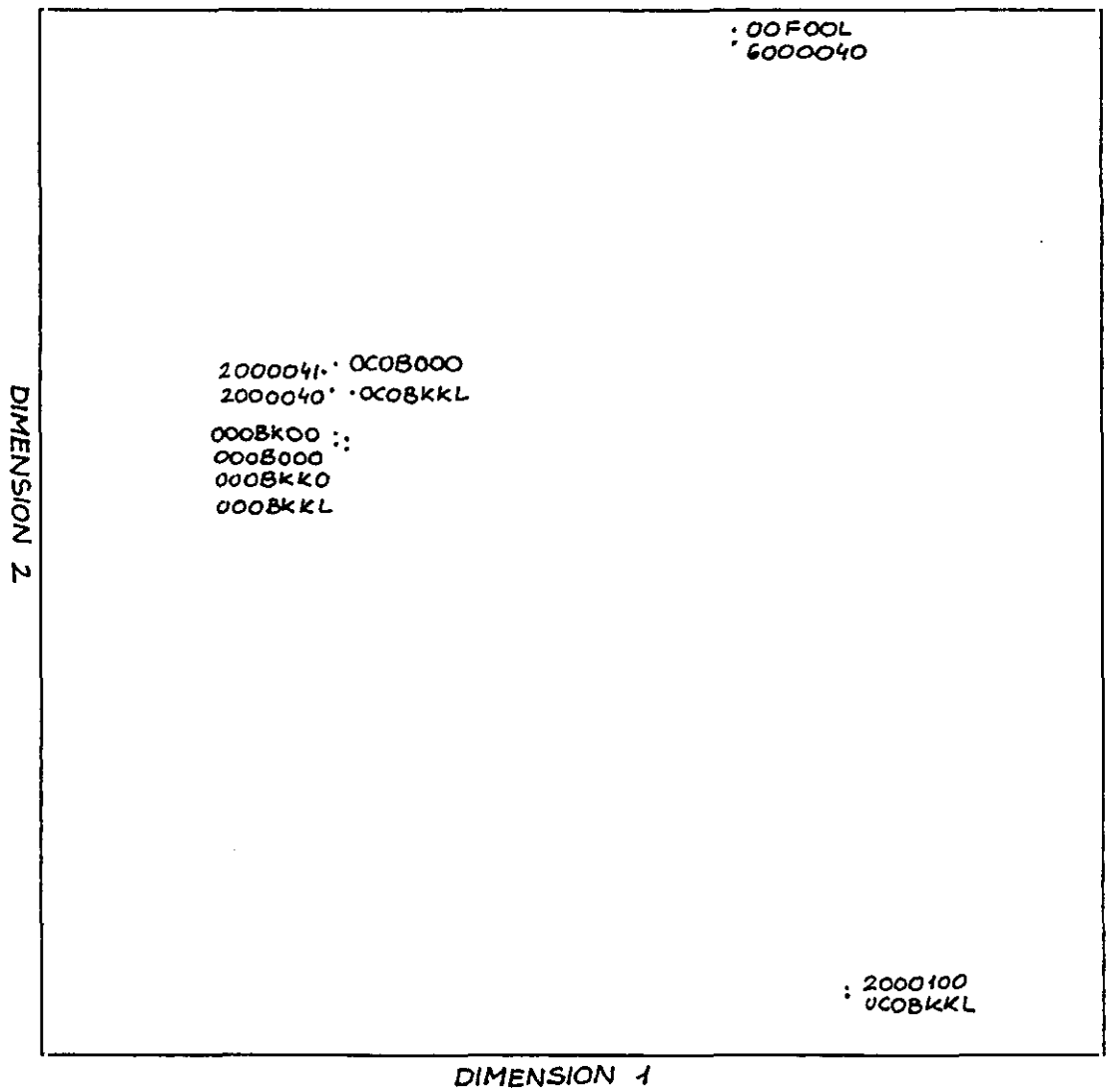


FIGURA 10. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre los métodos API 20C y resistotipado en C. glabrata.

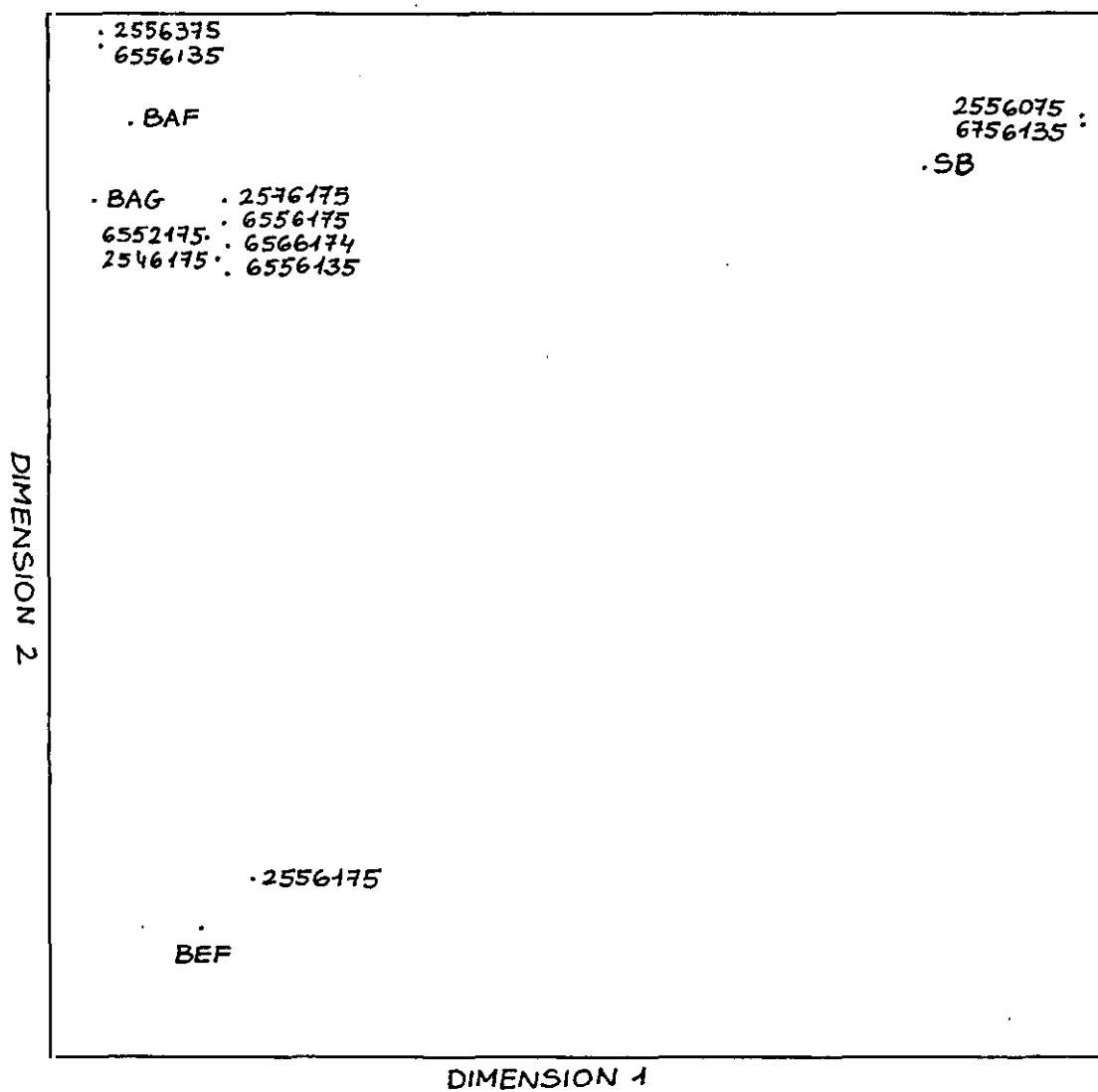


FIGURA 11. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre los métodos API 20C y morfotipado II en C. tropicalis.

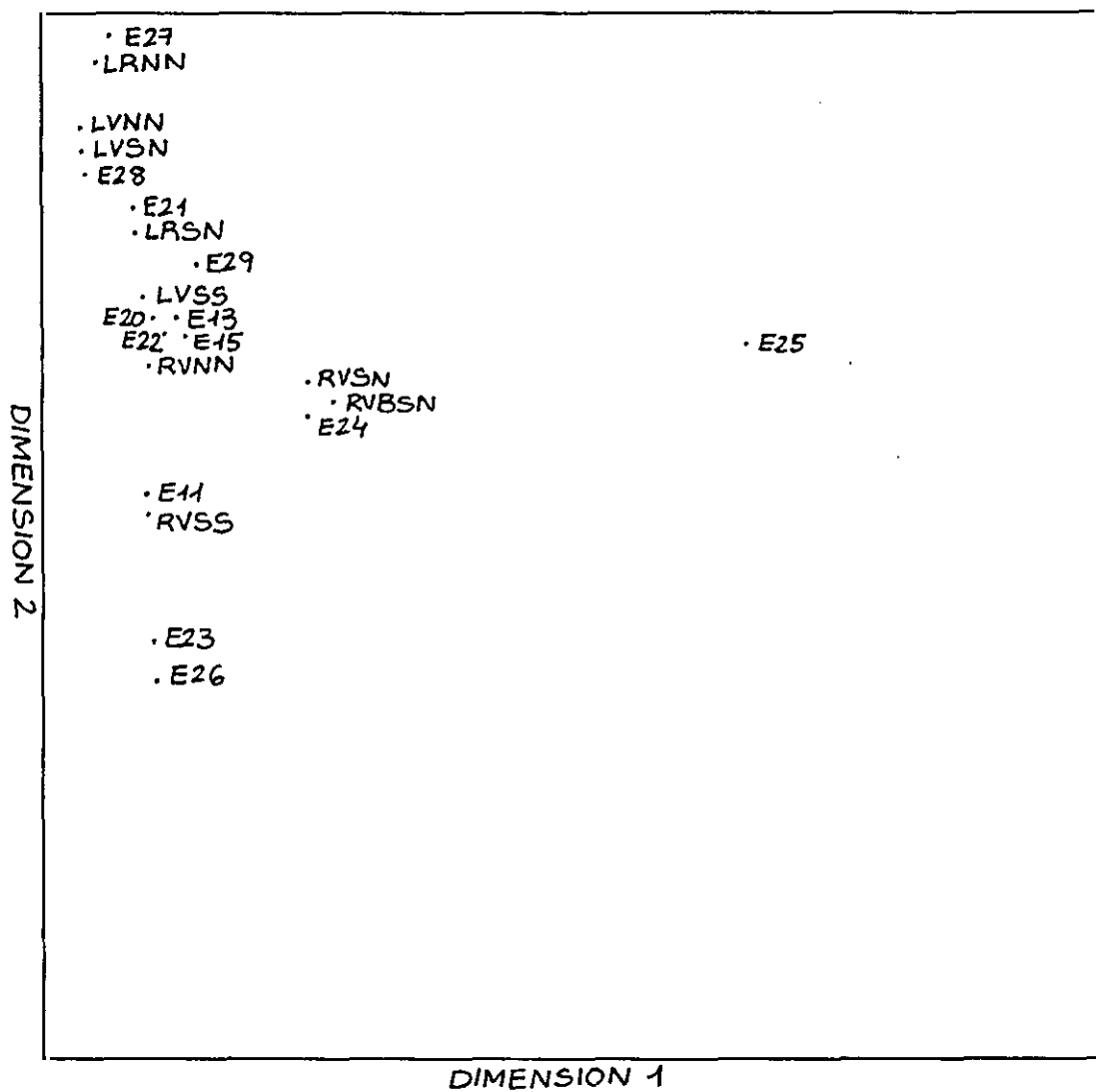


FIGURA 12. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre el perfil enzimático y el morfotipado AST en C. parapsilosis.

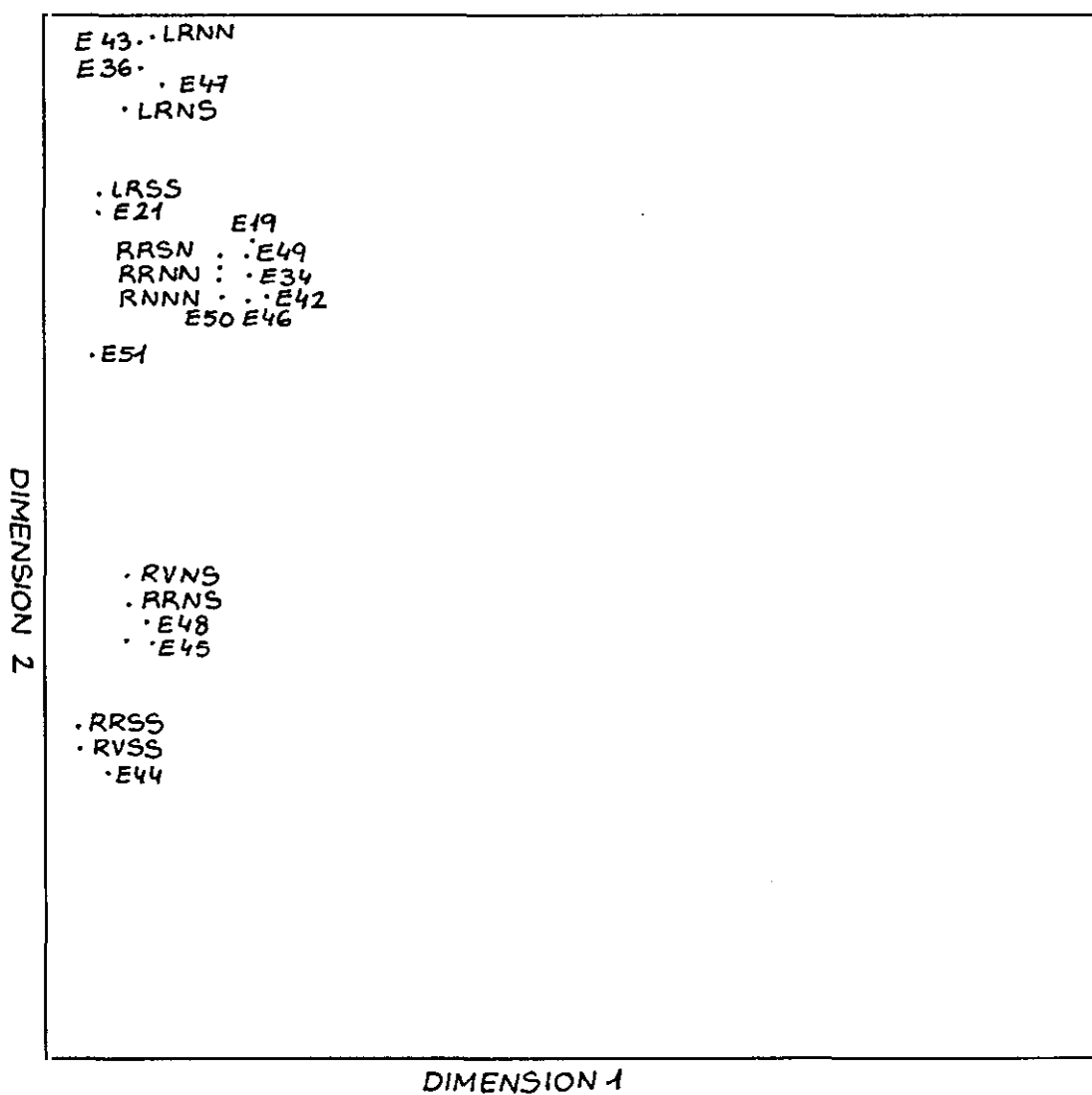


FIGURA 13. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre el perfil enzimático y el morfotipado AST en T. beigelii.

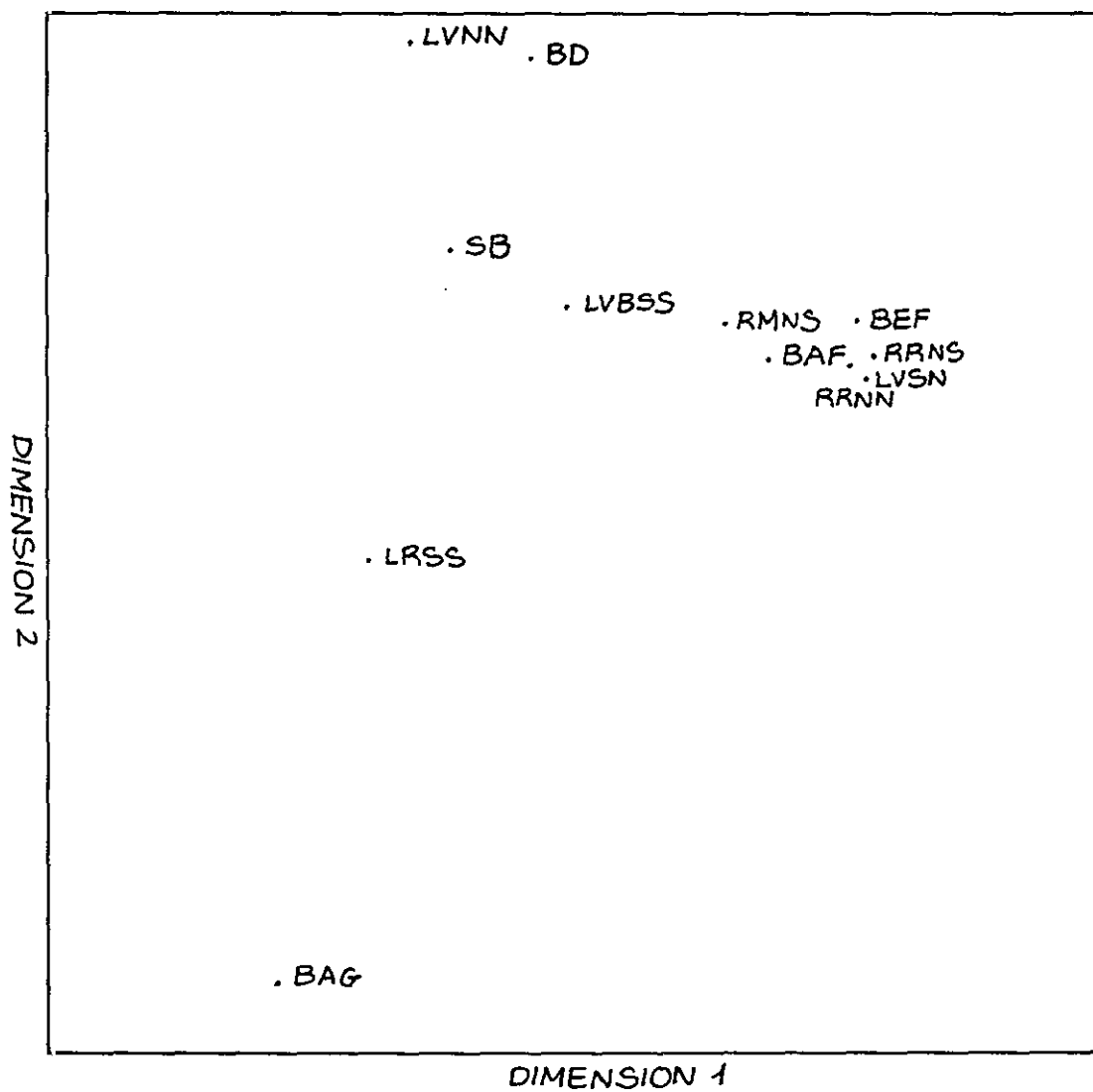


FIGURA 14. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre el morfotipado II y el morfotipado AST en *C. tropicalis*.

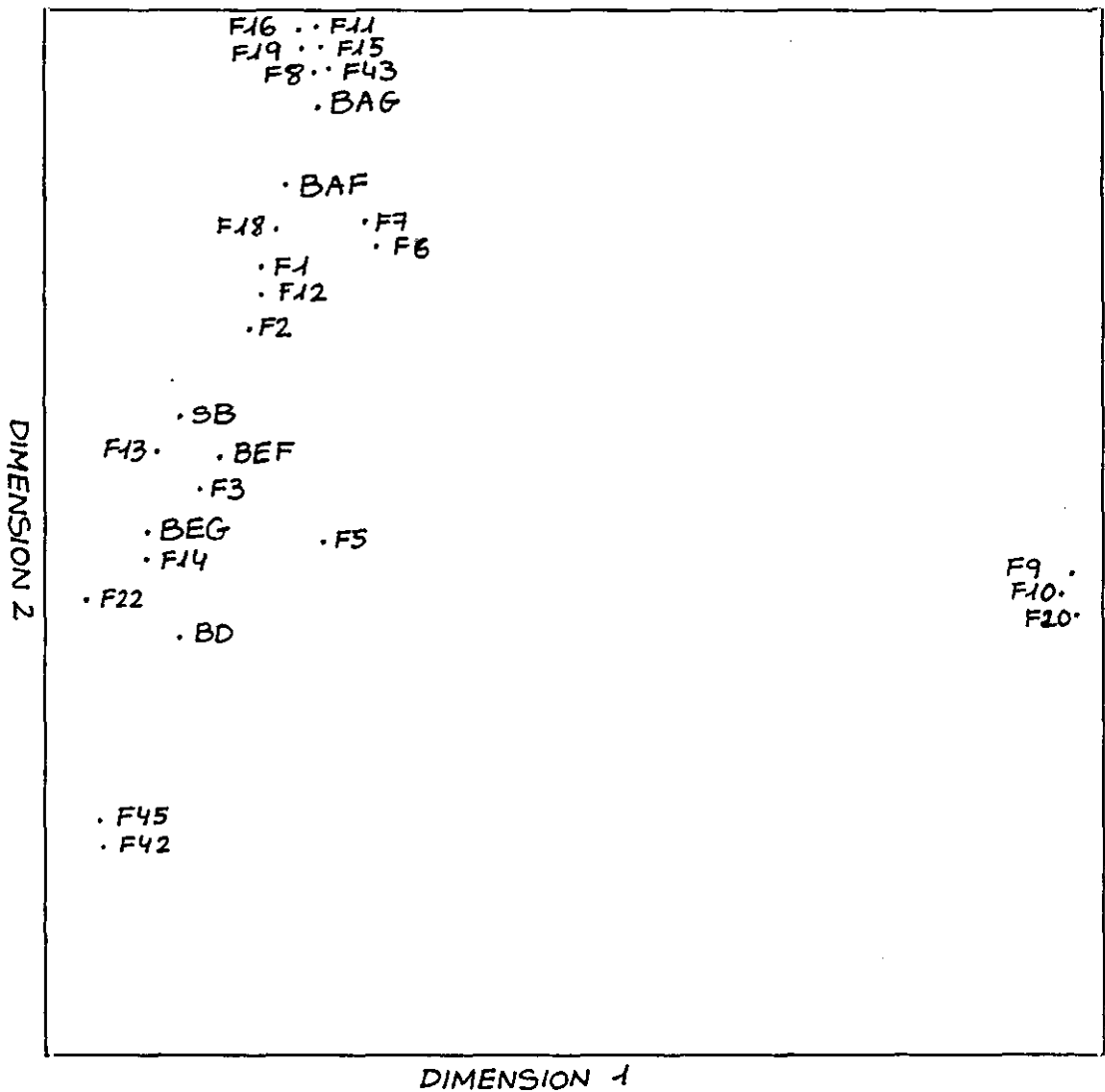


FIGURA 15. Representación en el espacio bidimensional del análisis de correspondencias establecido entre el morfotipado II y el perfil PSA en C. albicans.

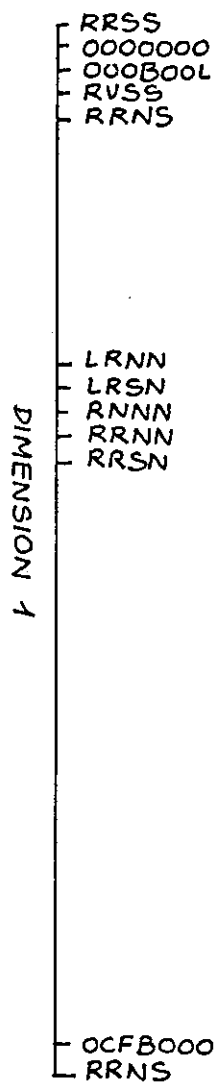


FIGURA 16. Representación en un sólo factor del análisis de correspondencias establecido entre el resistotipado y el perfil AST en T. beigelij.

V. TABLAS

TABLA 1. Porcentajes de distribución de las especies aisladas en cada uno de los grupos de muestras consideradas.

ESPECIE	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL
<u>C. albicans</u>	58,9	65	42,4	58,3	17,3
<u>C. tropicalis</u>	17,8	5,0	17,0	30,6	9,8
<u>C. parapsilosis</u>	2,8	1,7	4,0	5,6	32,3
<u>C. glabrata</u>	1,9	13,3	5,1	2,8	1,5
<u>C. guilliermondii</u>	3,7	1,7			9,0
<u>C. krusei</u>	4,7	3,3	2,0		3,8
<u>C. lusitaniae</u>	1,9	1,7	4,0		1,5
<u>C. famata</u>	1,9		2,0		1,5
<u>C. kefyr</u>			2,0	2,8	
<u>Candida sp</u>	0,9	1,7	2,0		5,3
<u>T. beigeli</u>	3,7	5,0	5,1		0,8
<u>Trichosporon sp</u>		1,7			0,8
<u>Cr. neoformans</u>			10,0		
<u>Cryptococcus sp</u>			1,0		0,8
<u>Rhodotorula sp</u>					5,4
<u>G. candidum</u>	1,9				2,3
<u>S. cerevisiae</u>			1,0		2,3
TOTAL	24,6	13,8	22,8	8,3	30,6

TABLA 2. Porcentaje de distribución de cada especie estudiada en los 5 grupos de muestras consideradas.

ESPECIES	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
<u>C.albicans</u>	33,5	20,79	22,3	11,2	12,2	43,2
<u>C.tropicalis</u>	30,2	4,8	27	17,5	20,6	14,5
<u>C.parapsilosis</u>	5,7	1,9	7,5	3,8	81,1	12,2
<u>C.glabrata</u>	11,1	44,4	27,8	5,6	11,1	4,1
<u>C.guilliermondii</u>	23,5	5,9			70,6	3,9
<u>C.krusei</u>	38,5	15,4	7,7		38,5	3
<u>C.lusitaniae</u>	22,2	11,1	44,4		22,2	2,1
<u>C.famata</u>	33,3		33,3		33,3	1,4
<u>C.kefyr</u>			66,7	33,3		0,7
<u>Candida sp</u>		14,3	14,3		71,4	1,7
<u>T.beigelii</u>	17,4	13	21,7		47,8	5,3
<u>Trichosporon sp</u>		50			50	0,5
<u>C.neoformans</u>			100			2,3
<u>Cryptococcus sp</u>			50		50	0,5
<u>Rhodotorula sp</u>					100	1,6
<u>G.candidum</u>	40				60	1,1
<u>S.cerevisiae</u>			25		75	0,9

TABLA 3a. Valores de CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalos encontrados en los antifúngicos estudiados para cada una de las especies.

ESPECIES	Miconazol			Econazol			Ketoconazol			Clotrimazol		
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango
<i>C. albicans</i>	0,5	1	<0,03-≥256	0,25	0,25	≤0,03-2	4	8	≤0,03-≥256	0,25	0,5	≤0,03-4
<i>C. tropicalis</i>	0,5	2	<0,03-256	0,5	2	≤0,03-4	8	16	≤0,03-≥256	0,25	1	≤0,03-2
<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,25	<0,03-4	0,25	0,5	≤0,03-4	0,06	1	≤0,03-8	0,06	0,06	≤0,03-0,25
<i>C. glabrata</i>	0,06	0,25	<0,03-0,5	0,06	1	≤0,03-1	0,25	1	≤0,03-2	0,12	0,5	≤0,03-0,5
<i>C. guilliermondii</i>	0,5	1	<0,03-1	0,25	1	≤0,03-1	0,06	8	≤0,03-8	0,12	0,5	≤0,03-0,5
<i>C. krusei</i>	0,25	0,5	<0,03-0,5	0,12	0,25	≤0,03-2	0,25	0,25	≤0,03-0,25	0,06	0,06	≤0,03-1
<i>C. lusitaniae</i>	2	2	0,06-2	2	2	≤0,03-2	16	0,25	0,12-≥256	4	4	0,06-4
<i>C. famata</i>	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	4	0,06-4	0,06	0,06	0,06
<i>C. kefyr</i>	0,06	0,25	0,06-≤256	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5	0,06-0,5	0,06	0,12	0,06-0,12
<i>C. zeylanoides</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06-0,12
<i>C. rugosa</i>	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
<i>C. lipolytica</i>	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06	0,06	0,06
<i>C. pintolopesii</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06	0,06	0,06
<i>C. pelliculosa</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	0,06	0,06	0,25	2	0,25-2
<i>C. neoformans</i>	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
<i>C. laurentii</i>	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	≤0,03-0,06	0,06	0,06	≤0,03-0,006	0,06	0,06	0,06
<i>C. albidus</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
<i>G. candidum</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06-0,12	0,06	0,5	0,06-0,5	0,06	0,5	0,06-0,5
<i>R. rubra</i>	4	4	0,06-4	0,25	0,5	0,06-0,5	0,06	0,12	0,06-0,12	0,12	0,12	0,06-0,12
<i>R. glutinis</i>	0,06	2	0,06-2	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12
<i>S. cerevisiae</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	≤0,03-0,06
<i>T. beigeli</i>	0,06	0,25	0,06-≤256	0,06	0,25	0,06-64	0,06	4	0,06-8	0,06	0,25	0,06-0,5
<i>T. penicillatum</i>	0,25	0,25	0,25	0,06	0,06	0,06	4	4	4	0,06	0,06	0,06
<i>T. capitatum</i>	0,12	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06	0,5	0,5	0,5	0,06	0,06	0,06

Tabla 3b. Valores de CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalos encontrados en los antifúngicos estudiados para cada una de las especies.

ESPECIES	Fluconazol			Anfotericina B			Ciclopirox			Ajo		
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango
<u>C. albicans</u>	128	≥256	<0,03-≥256	0,5	0,5	≤0,03-64	1	1	0,06-4	1/1280	1/1280	1/5120-1/640
<u>C. tropicalis</u>	128	≥256	<0,03-≥256	0,25	0,5	≤0,03-2	1	2	0,5-2	1/2560	1/1280	1/2560-1/640
<u>C. parapsilosis</u>	0,25	1	<0,03-≥256	0,25	0,5	≤0,03-1	1	2	0,5-2	1/1280	1/1280	1/2560-1/1280
<u>C. glabrata</u>	0,5	128	<0,03-≥256	0,25	0,5	≤0,03-0,5	1	2	0,5-2	1/2560	1/1280	1/2560-1/1280
<u>C. guilliermondii</u>	1	≥256	<0,03-≥256	0,25	0,25	≤0,03-0,25	1	4	1-4	1/1280	1/1280	1/1280
<u>C. krusei</u>	4	8	<0,03-8	0,5	1	0,12-1	2	2	0,5-2	1/2560	1/640	1/2560-1/1280
<u>C. lusitaniae</u>	32	128	0,12-128	0,25	32	0,12-32	1	4	1-4	1/1280	1/1280	1/10240
<u>C. famata</u>	0,06	4	0,06-4	0,06	0,5	0,06-0,5	0,12	2	0,06-2	1/640	1/640	1/2560-1/640
<u>C. kefyr</u>	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	1/2560	1/2560	1/2560
<u>C. zeylanoides</u>	0,06	0,06	0,06	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1/1280	1/1280	1/1280
<u>C. rugosa</u>	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1/640	1/640	1/640
<u>C. lipolytica</u>	0,25	0,25	0,25	0,06	0,06	0,06	2	2	2	1/1280	1/1280	1/1280
<u>C. pintolopesii</u>	0,12	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06	0,5	0,5	0,5	1/2560	1/2560	1/2560
<u>C. pelliculosa</u>	1	1	1	0,12	0,25	0,12-0,25	1	1	1	1/640	1/640	1/640
<u>C. neoformans</u>	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	0,25	0,06-0,25	0,06	0,06	≤0,03-0,25	1/640	1/320	1/640-1/320
<u>C. laurentii</u>	0,06	0,06	0,06	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1/1280	1/1280	1/1280
<u>C. albidus</u>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	1/640	1/640	1/640
<u>G. candidum</u>	1	2	0,06-8	0,5	0,5	0,25-0,5	1	2	0,06-2	1/640	1/320	1/1280-1/320
<u>R. rubra</u>	8	16	0,25-16	0,06	0,25	0,06-0,25	2	2	0,25-2	1/640	1/640	1/1280-1/640
<u>R. glutinis</u>	16	64	16-64	0,06	0,06	0,06	0,12	0,5	0,12-0,5	1/1280	1/1280	1/1280
<u>S. cerevisiae</u>	0,06	0,5	0,06-0,5	0,12	0,25	0,12-0,25	1	1	0,25-1	1/1280	1/320	1/1280-1/320
<u>T. beigeli</u>	0,06	128	0,06-≤256	0,25	2	≤0,03-64	1	1	≤0,03-4	1/1280	1/640	1/5120-1/320
<u>T. penicillatum</u>	4	4	4	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1/1280	1/1280	1/1280
<u>T. capitatum</u>	1	1	1	0,06	0,06	0,06	0,5	0,5	0,5	1/1280	1/1280	1/1280

TABLA 4. Valores de Concentraciones Mínimas Inhibitorias encontradas en las cepas patrón ensayadas para los agentes antifúngicos incluidos en el estudio.

CONTROLES	AB	MICO	ECO	KETO	CLO	FLU	CIC	AJO
ATCC 10231	0,25	0,25	0,25	0,12	1	1	1	1/1280
ATCC 18803	0,25	0,06	0,25	0,25	0,12	0,25	1	1/640
Rc7	0,25	0,5	0,25	4	0,25	256	1	1/640
Rc9	0,5	0,5	0,25	4	0,25	256	1	1/640
12C	0,25	0,25	0,12	4	0,25	64	1	1/640
CPJR	0,25	0,25	0,25	0,12	1	1	1	1/1280

TABLA 5. Biotipos API20C AUX encontrados en C. albicans.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
2172174			1			(0,5)
2174174		1				(0,5)
2546174		2		1		(1,6)
2556174	3	4		3	3	(6,9)
2566174	2	1	3		1	(3,7)
2572174	1	1				(1,1)
2576174	48	28	36	16	16	(76,6)
2776174	5	1		1	2	(4,8)
6576174	3	1	1			(2,7)
6776175	1		1			(1,1)
TOTAL%	(33,5)	(20,7)	(22,3)	(11,2)	(12,2)	188(100)

TABLA 6. Biotipos API20C AUX encontrados en C. tropicalis y su distribución en los distintos grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL %
2546175			1			(1,6)
2556075	1					(1,6)
2556175	7		6	5	4	(34,9)
2556375	4	1	2	1		(12,7)
2576175	6	1	5	1	4	(27)
6552175			1			(1,6)
6556135	1	1			2	(6,3)
6556175				3	1	(6,3)
6566174					1	(1,6)
6576175					1	(1,6)
6756135			1			(1,6)
TOTAL %	(30,2)	(4,8)	(27)	(17,5)	(20,6)	63(100)

TABLA 7. Biotipos API20C AUX encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
2742175					1	(1,9)
2746174	1				1	(3,8)
2752175					2	(3,8)
2756175					1	(1,9)
6656175	1	1				(3,8)
6652175					1	(1,9)
6746175					1	(1,9)
6752135					6	(11,3)
6756135			3	1	11	(28,3)
6756175	1		1	1	16	(35,8)
6772175					3	(5,7)
TOTAL%	(5,7)	(1,9)	(7,5)	(3,8)	(81,1)	53(100)

TABLA 8. Biotipos API20C AUX encontrados en T. beigelii y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
2544775	1				(4,3)
2740775	1			1	(8,7)
2744737				1	(4,3)
2744774		1	2	1	(17,4)
2744775	2			1	(13)
2744777				2	(8,7)
2745737				2	(8,7)
2545775			1	1	(8,7)
2765737				1	(4,3)
6745775		1		1	(8,7)
6747774		1			(4,3)
6757775			1		(4,3)
6767774			1		(4,3)
TOTAL%	(17,4)	(13)	(21,7)	(47,8)	23(100)

TABLA 9. Biotipos API20C AUX encontrados en *C. glabrata* y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
2000040	2	7	5	1		(83,3)
2000041					1	(5,6)
2000100		1				(5,6)
6000040					1	(5,6)
TOTAL%	(11,1)	(44,4)	(27,8)	(5,6)	(11,1)	18(100)

TABLA 10. Biotipos API20C AUX encontrados en las cepas control ensayadas.

CONTROLES	BIOTIPO API20C AUX
<u>C. albicans</u> ATCC 10231	2576174
<u>C. laurentii</u> ATCC 18803	2777773
<u>C. kefyr</u> ATCC 28838	6622466
CPJR	6446071
Rc7	2576175*
Rc9	2776174
12C	2576174

* C. albicans que asimiló melizitosa.

TABLA 11. Perfiles enzimáticos encontrados en C. albicans y su distribución en los grupos de muestras considerados.

TIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
E1	3	4	8	6	5	26(14,1)
E2			1	1	1	3(1,6)
E3					1	1(0,5)
E4	3	1	1			5(2,7)
E6	5		3	1	3	12(6,5)
E7			1		1	2(1,1)
E8	1					1(0,5)
E9			1			1(0,5)
E10	24	21	13	4	8	70(37,8)
E11	2	1	2	1		6(3,2)
E12	6	4	5	2	1	18(9,7)
E13	2					2(1,1)
E14	1			2		3(1,6)
E15			2		1	3(1,6)
E16	6	8	1	2	2	19(10,3)
E17	3			1		4(2,2)
E18	1		3	1		5(2,7)
E19	2					2(1,1)
E21	2					2(1,1)
TOTAL	61	39	41	21	23	185(100)

TABLA 12. Perfiles enzimáticos encontrados en *C. tropicalis* y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
E6	1			1	1	3(4,8)
E10	2		4		1	7(11,1)
E11			1		3	4(6,3)
E12					1	1(1,6)
E16	6	2	2	6	1	17(26,9)
E18	1					1(1,6)
E19	2		1			3(4,8)
E31			3			3(4,8)
E32				2		2(3,2)
E34			1			1(1,6)
E35	4				2	6(9,5)
E36		1	3	2	4	10(15,9)
E37	3					3(1,6)
E38			1			1(1,6)
E39			1			1(1,6)
TOTAL	19	3	17	11	13	63(100)

TABLA 13. Perfiles enzimáticos encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
E11	2		1		15	18(40)
E13			1		9	10(18,8)
E15			2		1	3(5,6)
E20					3	3(5,6)
E21					1	1(1,9)
E22	1				1	2(3,8)
E23					6	6(11,3)
E24					1	1(1,9)
E25					2	2(3,8)
E26		1		2		3(5,6)
E27					1	1(1,9)
E28					2	2(3,8)
E29					1	1(1,9)
TOTAL	3	1	4	2	43	53(100)

TABLA 14. Perfiles enzimáticos encontrados en T. beigeli y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
E19			1		1(4,3)
E21	2				2(8,7)
E34		1			1(4,3)
E36				1	1(4,3)
E42				1	1(4,3)
E43				2	2(8,7)
E44				1	1(4,3)
E45				1	1(4,3)
E46	2		1	3	6(26)
E47			1		1(4,3)
E48			2		2(8,7)
E49				1	1(4,3)
E50		2			2(8,7)
E51				1	1(4,3)
TOTAL	4	3	5	11	23(100)

TABLA 15. Perfiles enzimáticos encontrados en C. glabrata y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
E3		1	1			2(11,1)
E15	2	4	3	1	2	12(66,6)
E17		2				2(11,1)
E28		1				1(5,5)
E38			1			1(5,5)
TOTAL	2	8	5	1	2	18(100)

TABLA 16. Perfiles enzimáticos encontrados en las cepas control ensayadas.

CONTROLES	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>C.albicans</u> ATCC 10231	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
<u>C.laurentii</u> ATCC 18803	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
<u>C.kefyr</u> ATCC 28838	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
CPJR	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Rc7	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Rc9	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
12C	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0

TABLA 17. Porcentajes de actividades enzimáticas encontradas con API ZYM en las principales especies analizadas.

ESPECIES	N° cepas	ENZIMAS																		
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<u>C. albicans</u>	188	70,2	100	100	85	100	99	74,5	0	0	99,5	100	0	0	0	94,5	12,8	85,6	0	0
<u>C. tropicalis</u>	63	76,2	100	100	11,1	100	95,2	73	0	0	100	96,8	0	0	0	95,2	73	63,5	0	0
<u>C. parapsilosis</u>	53	96,1	100	100	37,2	96,1	76,5	25,5	0	0	100	100	0	0	0	80,4	1,9	0	1,9	0
<u>T. beigelii</u>	23	96,6	100	100	56,5	95,7	52,2	60,8	0	0	100	100	4,3	30,4	0	65,2	73,9	60,9	0	0
<u>C. glabrata</u>	18	83,3	100	100	5,6	100	94,4	77,8	0	0	94,4	94,4	5,6	5,6	0	0	0	0	0	0
<u>C. guilliermondii</u>	17	94,1	88,2	100	11,8	100	82,3	82,3	0	0	100	94,1	0	0	5,9	88,2	70,6	0	0	0
<u>C. krusei</u>	13	53,8	100	100	0	100	84,6	84,6	0	0	100	100	0	0	0	0	11,4	0	0	0
<u>C. neoformans</u>	10	20	80	90	0	90	10	10	0	0	100	100	0	0	90	90	100	50	0	0
<u>C. lusitanae</u>	9	100	100	100	11	100	88,8	88,8	0	0	100	100	0	0	0	100	100	11	0	0

TABLA 18. Resistotipos encontrados en C. albicans y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
OCFBKKL		1		1		2(1,1)
OCFBKKO	2					2(1,1)
OCFBKOL	1					1(0,5)
OCFBKOO	3					3(1,6)
OCFBOOL	2	1				3(1,6)
OCFBOOO	1	2				3(1,6)
OCFOOOO		1	1			2(1,1)
OCOBKKL	3					3(1,6)
OCOBKKO	1				1	2(1,1)
OCOBKOL		1	1			2(1,1)
OCOBKOO	2	2	4		2	10(5,3)
OCOBOOL	6	2	8	3	5	24(12,8)
OCOBOOO	6	11	8	4	10	39(20,7)
OCOOKOL				1	1	2(1,1)
OCOOOOL	3	3	2			8(4,3)
OCOOOOO	14	4	9	4	1	32(17)
OOFBKKL				1		1(0,5)
OOOBKOO	5	1				6(3,2)
OOOBOOL	1	2	1			4(2,1)
OOOBOOO	7	4	4	1	2	18(9,6)
OOOOKOO			2			2(1,1)
OOOOOOL		1				1(0,5)
OOOOOOO	6	3	2	6	1	18(9,6)
TOTAL	63	39	42	21	23	188(100)

TABLA 19. Resistotipos encontrados en C. tropicalis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
OCFBKKL					1	1(1,6)
OCFBKKO			1	1		2(3,2)
OCFBKOL	1		1			2(3,2)
OCFBOOL					2	2(3,2)
OCFBOOO	1					1(1,6)
OCOBKKL					1	1(1,6)
OCOBKKO	1		3	1	1	6(9,5)
OCOBKOL			1			1(1,6)
OCOBKOO				2		2(3,2)
OCOBOOL	2		1	1		4(6,3)
OCOBOOO	7	2	6	5	4	24(38,1)
OCOOOOO	1	1				2(3,2)
OOOBKKL					1	1(1,6)
OOOBKOO				1		1(1,6)
OOOBOOO	1					1(1,6)
OOOOKKL			1			1(1,6)
OOOOKOL					1	1(1,6)
OOOOOOL	1					1(1,6)
OOOOOOO	1		2			3(4,8)
UCOBKOO	3					3(4,8)
TOTAL	19	3	17	11	13	63(100)

TABLA 20. Resistotipos encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
OCFBKKL					4	4(7,5)
OCFOOOL					1	1(1,9)
OCOBKKL					16	16(30,2)
OCOBKKO					1	1(1,9)
OCOBKOL					1	1(1,9)
OCOOKKL	1		1		5	7(13,2)
OCOOKOL	1					1(1,9)
OCOOOOL				1	3	4(7,5)
OOOBKKL	1	1	1		5	8(15,1)
OOOOKKL			2		4	6(11,3)
OOOOKOL					1	1(1,9)
OOOOOOL				1	1	2(3,8)
OOOOOOO					1	1(1,9)
TOTAL	3	1	4	2	43	53(100)

TABLA 21. Resistotipos encontrados en T. beigelii y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
OCFBOOL	1		1	3	5(21,7)
OCFB000			1	2	3(13)
OCFO000				1	1(4,3)
OOFBOOL	1				1(4,3)
OOFO00L				1	1(4,3)
OOOBOOL	1	2			3(13)
OOOB000		1		3	4(17,4)
OOOO000	1		2		3(13)
UCFBOOL			1	1	2(8,7)
TOTAL	4	3	5	11	23(100)

TABLA 22. Resistotipos encontrados en C. glabrata y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
OCOBKKL					1	1(5,6)
OCOBOOO		1				1(5,6)
OOFOOOL					1	1(5,6)
OOOBKKL		1				1(5,6)
OOOBKKO	1		1			2(11,1)
OOOBKOO		2	3	1		6(33,3)
OOOBOOL	1	2	1			4(22,2)
OOOBOOO		1				1(5,6)
UCOBKKL		1				1(5,6)
TOTAL	2	8	5	1	2	18(100)

TABLA 23. Frecuencias relativas de resultados positivos a cada uno de los compuestos químicos utilizados en la técnica de resistotipado para las 5 especies mayoritarias.

ESPECIES	URE	CIT	SFC	BOR	SAL 11%	SAL 13%	MC
<u>C.albicans</u>	0	72,8	9	64,9	18	0,5	27
<u>C.tropicalis</u>	4,8	80,9	12,7	82,5	34	19	23,8
<u>C.parapsilosis</u>	0	66	9,4	56,6	84	79,2	94,3
<u>T.beigelii</u>	8,7	47,8	56,5	78,3	0	0	52,2
<u>C.glabrata</u>	5,6	11,1	5,6	94,4	61	27,8	44,4

TABLA 24. Resistotipos encontrados en las cepas control ensayadas.

CONTROLES	RESISTOTIPO
<u>C. albicans</u> ATCC 10231	OCOBOL
<u>C. laurentii</u> ATCC 18803	OOOOOO
CPJR	OOOBOL
Rc7	OCOBOO
Rc9	UCOOOL
12C	OCOOOO

TABLA 25. Morfotipos encontrados en C. albicans y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
0000	4	4	3	1	1	13(6,9)
2330		1	1			2(1,1)
3220			2			2(1,1)
3230	1			1		2(1,1)
3330	2	1	3			6(3,2)
5311	1				1	2(1,1)
5321	1				1	2(1,1)
5330			2			2(2,1)
5340	1	2				3(1,6)
5514		1		1		2(1,1)
5521				1	1	2(1,1)
5531	1		1			2(1,1)
5540	1		1	1	1	4(2,1)
7310	1		2		1	4(2,1)
7320	2				1	3(1,6)
7330	2	7	2			11(5,9)
7331	1			1		2(1,1)
7340	4	3	9	1	3	20(10,6)
7346		1	1	1		3(1,6)
7530	3		2	1	1	7(3,7)
7540	27	13	7	8	10	65(36,4)
7541	1				1	2(1,1)
7546	1	1				2(1,1)
OTROS	9	4	5	3	2	23(12,2)
TOTAL	33,5	20,7	22,3	11,2	12,2	188(100)

TABLA 26. Morfotipos I encontrados en C. tropicalis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
0000	2		2		3	7(11,1)
0006			1			1(1,6)
5214			1		3	4(6,3)
5341					1	1(1,6)
5540		1				1(1,6)
7214			1			1(1,6)
7334				1		1(1,6)
7336	1					1(1,6)
7346				1		1(1,6)
7516	1					1(1,6)
7524			1			1(1,6)
7530			1			1(1,6)
7532			2			2(4,8)
7536				1		1(1,6)
7540	10		6	2	3	21(33,3)
7541			1			1(1,6)
7542		1				1(1,6)
7546	4	1	1	6	2	14(22,2)
17548					1	2(3,2)
TOTAL	30,2	4,8	27	17,5	20,6	63(100)

TABLA 27. Morfotipos I encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
0000	1	1	1	1	9	13(24,5)
0001				1	4	5(9,4)
0002					1	1(1,9)
0004					4	4(7,5)
0005					2	2(3,8)
0006	2		3		22	27(50,9)
7336					1	1(1,9)
TOTAL%	5,7	1,9	7,5	3,8	81,1	53(100)

TABLA 28. Morfotipos I encontrados en T. beigelii y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
5318		1			1(4,3)
5524				1	1(4,3)
7511				3	3(13)
7516	1				1(4,3)
7521			1		1(4,3)
7531			1		1(4,3)
7536			2		2(8,7)
7540	1	1			2(8,7)
7541	1	1	2	2	6(26,1)
7546			1	1	2(8,7)
7548	1			2	3(13)
TOTAL	17,4	13	21,7	47,8	23(100)

TABLA 29. Porcentajes de positividad para cada una de las características consideradas en el morfotipado I para las 5 especies mayoritarias.

CARACTERISTICA	COD	CA	CT	CP	TB	CG
BORDE COLONIA	0	6,9	12,7	98,1	-	100
	1	1	-	-	-	-
	2	1,6	-	-	-	-
	3	6,9	-	-	-	-
	5	15,4	9,5	-	8,6	-
	7	68	77,8	1,9	91,4	-
	ANCHURA MARGEN	0	6,9	12,7	98,1	-
1		0,5	-	-	-	-
2		4,2	7,9	-	-	-
3		39,4	6,4	1,9	4,3	-
5		48,9	73	-	95,7	-
GROSOR MARGEN		0	6,9	12,7	98,1	-
	1	5,3	9,5	-	21,6	-
	2	6,9	1,6	-	8,6	-
	3	24,5	9,6	1,9	13	-
	4	54,2	66,6	-	56,5	-
	SUPERFICIE COLONIA	0	81,9	47,6	24,5	8,7
1		9	3,2	9,4	47,7	-
2		2,1	4,8	1,9	-	-
4		3,2	11,1	7,5	4,3	-
5		-	-	3,8	-	-
6		3,2	30,2	52,8	21,7	-
8		-	3,2	-	17,3	-

TABLA 30. Morfotipos encontrados en las cepas control ensayadas.

CONTROLES	MORFOTIPADO I
<u>C. albicans</u> ATCC 10231	0000
<u>C. laurentii</u> ATCC 18803	0000
<u>C. kefir</u> ATCC 28838	7240
CPJR	0000
Rc7	0000
Rc9	5331
12C	7540

TABLA 31. Morfotipos encontrados en C. albicans con el morfotipado II y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
SB	4	4	3	1	1	13(6,9)
BD	14	6	15	7	5	47(24,9)
BEG	4		3		2	9(4,8)
BEF	10	13	13	3	3	42(22,3)
BAG	1					1(0,5)
BAF	31	16	8	10	12	77(41)
TOTAL	63	39	42	21	23	188(100)

TABLA 32. Morfotipos II encontrados en C. tropicalis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
SB	1		3		6	10(15,9)
BD		1	1		1	3(4,8)
BEG			1			1(1,6)
BEF	1			2		3(4,8)
BAG	1		1			2(3,2)
BAF	16	2	11	9	6	43(68,3)
TOTAL	19	3	17	11	13	63(100)

TABLA 33. Morfotipos tipo II encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestral considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
SB	3	1	4	2	42	52(98,1)
BEF					1	1(1,9)
TOTAL	3	1	4	2	43	53(100)

TABLA 34. Morfotipos II encontrados en T. beigelii y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
BD		1			1	2(8,7)
BAG	1		1		2	4(17,4)
BAF	3	2	4		8	17(73,9)
TOTAL	4	3	5		11	23(100)

TABLA 35. Frecuencias relativas de aparición de cada uno de los morfotipos II posibles en cada una de las 5 especies mayoritarias.

ESPECIES	SB	BD	BEG	BEF	BAG	BAF
<u>C.albicans</u>	6,9	24,5	4,8	22,3	0,5	41
<u>C.tropicalis</u>	16,1		1,6	4,8	3,2	69,3
<u>C. parapsilosis</u>	98,1			1,9		
<u>T.beigelii</u>		8,7			17,4	73,9
<u>C.glabrata</u>	100					

TABLA 36. Morfotipos AST encontrados en C. albicans y su distribución en los grupos de muestras considerados.

TIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
LMSN			1		1	2(1,1)
LRNN	28	17	20	13	9	87(46,3)
LRNS	4		1	1		6(3,2)
LRSN	5	6	6		1	18(9,6)
LRSS	1	1				2(1,1)
LVNN	3	1				4(2,1)
LVNS	1			1		2(1,1)
LVSN	11	6	9	2	6	34(18,1)
LVSS	1	1	1		2	5(2,7)
RRNN	4	4	2	2	1	13(6,9)
RRNS		1			2	3(1,6)
RRSN		1				1(0,5)
RRSS			1			1(0,5)
RVBSS		1				1(0,5)
RVSN	4					4(2,1)
RVNN			1			1(0,5)
RVSS	1			2	1	4(2,1)
TOTAL	33,5	20,7	22,3	11,2	12,2	188(100)

TABLA 37. Morfotipos AST encontrados en *C. tropicalis* y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
LRNN	3				3	6(9,5)
LRNS		1				1(1,6)
LRSN		1	3			4(6,3)
LRSS	1					1(1,6)
LVBNN			1	2		3(4,8)
LVBNS			1			1(1,6)
LVBSN	2			1	1	4(6,3)
LVBSS	1		1	1		3(4,8)
LVNN			1			1(1,6)
LVSN			1		1	2(3,2)
LVSS	5		2	1	1	9(14,3)
RMNS	2					2(3,2)
RRNN	1					1(1,6)
RRNS				1	1	2(3,2)
RRSN			1		1	2(3,2)
RVBNN	1		4	2	1	8(12,7)
RVBSN		1		2		3(4,8)
RVNN	1			1	1	3(4,8)
RVNS	1					1(1,6)
RVSN			2		2	4(6,3)
RVSS	1					1(1,6)
TOTAL%	30,2	4,8	27	17,5	20,6	63(100)

TABLA 38. Morfotipos AST encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
LRNN		1		2	2	5(9,4)
LRSN					3	3(5,7)
LVNN	1				4	5(9,4)
LVSN			2		5	7(13,2)
LVSS					1	1(1,9)
RRNN	1				2	3(5,7)
RVBSN					2	2(3,8)
RVNN			1		9	10(18,9)
RVSN	1				14	15(28,3)
RVSS			1		1	2(3,8)
TOTAL%	5,7	1,9	7,5	3,8	81,8	53(100)

TABLA 39. Morfotipos AST encontrados en T. beigelii y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
LRNN			1	1	2(8,7)
LRNS				1	1(4,3)
LRSS	1				1(4,3)
RNNN				1	1(4,3)
RRNN	1				1(4,3)
RRNS		2	3	5	10(43,5)
RRSN		1			1(4,3)
RRSS			1	3	4(17,4)
RVNS	1				1(4,3)
RVSS	1				1(4,3)
TOTAL%	17,4	13	21,7	47,8	23(100)

TABLA 40. Morfotipos AST encontrados en C. glabrata y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
NO TIPABLE	1	5	4	1	2	13(72,2)
RBNN		2				2(11,1)
RRNN	1	1	1			3(16,7)
TOTAL%	11,1	44,4	27,8	5,6	11,1	18(100)

TABLA 41. Resultados globales de las frecuencias relativas obtenidas para cada una de las características consideradas en el método del morfotipado en AST.

CARACTERISTICA	CODIGO	CA	CT	CP	TB
TEXTURA	L	85,3	55,6	39,6	17,4
	R	14,7	44,4	60,4	82,6
COLOR	R	69,7	27	20,7	91
	V	28,7	33,3	75,5	8,7
	VB	0,5	34,9	3,7	0
	M	1	3,2	0	0
	B	0	0	0	0
BORDE	S	36,7	52,4	56,6	30,4
	N	63,3	47,6	43,4	69,6
HALO HIFAS	S	12,8	33,3	5,7	78,3
	N	87,2	66,7	94,3	21,7

TABLA 42. Morfotipos AST encontrados en las cepas controles ensayadas.

CONTROLES	MORFOTIPO AST
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	LRNN
<i>C. laurentii</i> ATCC 18803	LRNN
<i>C. kefyr</i> ATCC 28838	RRNS
CPJR	RRNN
Rc7	LRNN
Rc9	LRNN
12C	RRNS

TABLA 43. Perfil de resistencia a antifúngicos encontrados en C. albicans y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
F1	4	5	2		1	12(7,2)
F2	2	4			1	7(4,2)
F3	3	4	3	2	2	14(7,7)
F4	4	5	5		5	19(10,5)
F5	7	2	9	3	2	23(12,8)
F6	6	5	3	1	1	16(8,8)
F7	14	6	8	8	4	40(22)
F8			1			1(0,6)
F9	1					1(0,6)
F10	1					1(0,6)
F11				1		1(0,6)
F12	6					6(3,3)
F13	1	5		2	1	9(5,0)
F14	9	8		2	3	22(12,2)
F15	1					1(0,6)
F16			2			2(1,1)
F18		2				2(1,1)
F19	2					2(1,1)
F20					1	1(0,6)
F21				1		1(0,6)
F22		1				1(0,6)
F48	1					1(0,6)
F46				1		1(0,6)
TOTAL	63	39	41	21	21	185(100)

TABLA 44. Perfiles de resistencia a antifúngicos encontrados en C. tropicalis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
F1	2		1		4	7(10)
F2	3					3(5,1)
F4		1			2	3(5,1)
F5	1					1(1,7)
F6	2		2			4(6,8)
F7			2	2		4(6,8)
F9	1					1(1,7)
F11			1			1(1,7)
F12			2			2(3,4)
F13	1				1	2(3,4)
F14	2	1		1	1	5(8,5))
F15	2					2(3,4)
F20	1					1(1,7)
F23			1			1(1,7)
F24					1	1(1,7)
F25	2					2(3,4)
F26			1	1		2(3,4)
F27			1		1	2(3,4)
F28				1		1(1,7)
F29			3			3(5,1)
F30				1		1(1,7)
F31					1	1(1,7)
F32				1	1	2(3,4)
F33		1		1		2(3,4)
F34				1		1(1,7)
F35			1		1	2(3,4)
F36				1		1(1,7)
F37			2			2(3,4)
TOTAL	17	3	17	11	13	59(100)

TABLA 45. Perfiles de resistencia a antifúngicos encontrados en C. parapsilosis y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENTAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
F1	3		1		24	28(53,8)
F2					3	3(5,8)
F4					1	1(1,9)
F5		1				1(1,9)
F13					1	1(1,9)
F16					1	1(1,9)
F35			2	1	4	7(13,5)
F38					2	2(3,8)
F40			1		3	4(7,7)
F41					1	1(1,9)
F42					2	2(3,8)
F43				1		1(1,9)
TOTAL	3	1	4	2	42	52(100)



TABLA 46. Perfiles de resistencia a antifúngicos encontrados en T. beigelij y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENTAL	INVASIVO	PIEL	TOTAL%
F1		1	2	1	4(18)
F2				3	3(13,5)
F3			2		2(9)
F4	2				2(9)
F5	2				2(9)
F7		1			1(4,5)
F25				1	1(4,5)
F38		1			1(4,5)
F39				3	3(13,5)
F40			1	2	3(13,5)
TOTAL	4	3	5	11	22(100)

TABLA 47. Perfiles de resistencia a antifúngicos encontrados en C. glabrata y su distribución en los grupos de muestras considerados.

BIOTIPO	ORAL	GENITAL	INVASIVO	ORINA	PIEL	TOTAL%
F1		2		1		3(18,8)
F2		1				1(6,3)
F3	1	1	2			4(25)
F5		1	1		1	3(18,8)
F11					1	1(6,3)
F19		1				1(6,3)
F44	1					1(6,3)
F45			1			1(6,3)
F47			1			1(6,3)
TOTAL	2	6	5	1	2	16(100)

TABLA 48. Resultados globales de las frecuencias relativas de resistencias a las concentraciones utilizadas para los antifúngicos ensayados.

ESPECIE	[C]	A	AB	M	E	KE	CL	F	CI
CA	0	99,5	99,5	73,9	94,7	25	99,5	12,2	3,7
	1	0,5	0,5	23,4	4,3	24,5	0,5	26,6	96,3
	2	0	0	2,7	1,1	50,5	0	61,2	0
CT	0	100	93,7	52,4	71,4	47,6	86,3	33,4	20,6
	1	0	6,4	33,3	14,2	22,2	9,5	28,6	79,4
	2	0	0	14,3	14,3	30,2	3,2	38,1	0
CP	0	100	71,7	96,2	98,1	88,7	100	77,4	5,7
	1	0	16,9	3,8	1,9	7,5	0	13,2	94,3
	2	0	11,3	0	0	3,8	0	9,4	0
TB	0	100	86,9	91,3	91,3	82,6	100	60,9	39,1
	1	0	0	4,3	4,3	13	0	17,3	60,8
	2	0	13	4,3	4,3	4,3	0	21,7	0
CG	0	100	100	81,2	81,2	75	93,7	18,7	0
	1	0	0	12,5	6,2	25	0	6,2	100
	2	0	0	6,2	12,5	0	6,25	75	0

TABLA 49. Perfiles antifúngicos encontrados en las cepas control ensayadas.

CONTROLES	PERFIL ANTIFUNGICO A M E K C F CI
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0 0 0 0 0 0 1
<i>C. laurentii</i> ATCC 18803	0 0 0 0 0 0 0
CPJR	0 0 0 0 0 1 2
Rc8	0 0 0 0 0 0 0

TABLA 50. Especies encontradas en los 107 aislamientos de levaduras procedentes de muestras orales de una poblacion NO-VIH y otra VIH.

ESPECIES	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL%
<u>C. albicans</u>	22	41	63(58,9)
<u>C. tropicalis</u>	11	8	19(17,8)
<u>C. krusei</u>	6	0	6(5,6)
<u>C. guilliermondii</u>	2	2	4(3,7)
<u>T. beigeli</u>	4	0	4(3,7)
<u>C. parapsilosis</u>	2	1	3(2,8)
<u>C. famata</u>	1	1	2(1,9)
<u>C. lusitaniae</u>	0	2	2(1,9)
<u>C. glabrata</u>	2	0	2(1,9)
<u>G. candidum</u>	2	0	2(1,9)
TOTAL %	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 51. Biotipos API 20C AUX encontrados en las cepas de los exudados orales de las poblaciones VIH y NO-VIH estudiadas.

BIOTIPO API20C	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL%
2000040	2	0	2(1,9)
2000104	3	0	3(2,8)
2544775	1	0	1(0,9)
2556075	1	0	1(0,9)
2556174	0	3	3(2,8)
2556175	6	1	7(6,5)
2556375	2	2	4(3,7)
2566174	1	1	2(1,8)
2572174	1	0	1(0,9)
2576174	16	32	48(44,9)
2576175	2	4	6(5,6)
2740775	1	0	1(0,9)
2744775	2	0	2(1,8)
2746175	1	0	1(0,9)
2776174	2	3	5(4,7)
6000114	1	0	1(0,9)
6100004	1	0	1(0,9)
6176773	1	0	1(0,9)
6422434	1	0	1(0,9)
6442004	1	0	1(0,9)
6516375	0	1	1(0,9)
6556135	0	1	1(0,9)
6556175	0	1	1(0,9)
6556377	0	1	1(0,9)
6576174	1	2	3(2,8)
6576375	0	1	1(0,9)
6632375	1	0	1(0,9)
6756175	1	0	1(0,9)
6756377	1	0	1(0,9)
6776174	1	0	1(0,9)
6776177	1	0	1(0,9)
6776377	0	2	2(1,8)
TOTAL%	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 52. Resistotipos encontrados entre las levaduras aisladas de los exudados orales de las poblaciones NO-VIH y VIH estudiadas.

RESISTOTIPO	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL %
OCFBKKL	0	2	2(1,9)
OCFBKKO	0	2	2(1,9)
OCFBKOO	1	2	3(2,8)
OCFBOOL	3	0	3(2,8)
OCFBOOO	0	2	2(1,9)
OCOBKKL	2	1	3(2,8)
OCOBKKO	1	1	2(1,9)
OCOBKOL	0	1	1(0,9)
OCOBKOO	0	2	2(1,9)
OCOBOOL	2	7	9(8,4)
OCOBOOO	10	5	15(14)
OCOOKKL	2	0	2(1,9)
OCOOKOL	0	1	1(0,9)
OCOOOOL	0	3	3(2,8)
OCOOOOO	5	12	17(15,9)
OOFBOOL	1	0	1(0,9)
OOOBKKL	2	1	3(2,8)
OOOBKKO	1	0	1(0,9)
OOOBKOO	2	3	5(4,7)
OOOBOOL	5	2	7(6,5)
OOOBOOO	5	3	8(7,5)
OOOOOOL	1	1	2(1,9)
OOOOOOO	6	3	9(8,4)
UCOBKOO	2	1	3(2,8)
UOOOOOL	1	0	1(0,9)
TOTAL %	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 53. Morfotipos I encontrados entre las levaduras aisladas de los exudados orales de las poblaciones NO-VIH y VIH estudiadas.

MORFOTIPO I	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL %
0000	8	6	14(13,1)
0001	2	0	2(1,9)
0006	1	1	2(1,9)
1340	0	1	1(0,9)
2340	0	1	1(0,9)
3230	0	1	1(0,9)
3330	1	1	2(1,9)
5311	0	1	1(0,9)
5324	0	1	1(0,9)
5330	1	0	1(0,9)
5334	0	1	1(0,9)
5340	0	1	1(0,9)
5345	0	1	1(0,9)
5531	1	0	1(0,9)
5534	0	1	1(0,9)
5540	1	1	2(1,9)
5541	1	0	1(0,9)
7221	1	0	1(0,9)
7234	1	0	1(0,9)
7310	0	1	1(0,9)
7320	1	1	2(1,9)
7330	2	0	2(1,9)
7331	1	0	1(0,9)
7332	0	1	1(0,9)
7336	1	0	1(0,9)
7340	0	4	4(3,7)
7516	1	1	2(1,9)
7520	2	0	2(1,9)
7530	0	3	3(2,8)
7540	19	22	41(38,3)
7541	2	1	3(2,8)
7546	2	3	5(4,7)
7548	3	0	3(2,8)
TOTAL %	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 54. Morfotipos II encontrados en las cepas de levaduras aisladas de los exudados orales de las poblaciones NO-VIH y VIH estudiadas.

MORFOTIPO II	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL%
SB	11	7	18(16,2)
BD	5	11	16(14,4)
BEF	5	5	10(9)
BEG	2	2	4(3,6)
BAG	2	4	6(5,4)
BAF	26	29	55(49,5)
TOTAL %	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 55. Morfotipos AST encontrados entre las levaduras procedentes de los exudados orales de las poblaciones NO-VIH y VIH estudiadas.

MORFOTIPO AST	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL %
LBSS	1	0	1(0,9)
LNSS	0	1	1(0,9)
LRNN	7	26	33(29,7)
LRNS	4	1	5(4,7)
LRSN	3	2	5(4,7)
LRSS	4	1	5(4,7)
LVBSN	2	0	2(1,9)
LVBSS	0	1	1(0,9)
LVNN	4	0	4(3,7)
LVNS	0	1	1(0,9)
LVSN	5	7	12(11,2)
LVSS	4	2	6(5,6)
RBNS	1	0	1(0,9)
RBSS	2	0	2(1,9)
LMNS	2	0	2(1,9)
RRNN	3	6	9(8,4)
RRSS	1	0	1(0,9)
RVBNN	0	1	1(0,9)
RVBSN	0	1	1(0,9)
RVNN	1	4	5(4,7)
RVNS	2	0	2(1,9)
RVSN	2	1	3(2,8)
RVSS	4	0	3(2,8)
TOTAL %	52(48,6)	55(51,4)	107(100)

TABLA 56. Perfiles enzimáticos encontrados en las cepas de C. albicans aisladas de muestras orales en las poblaciones NO-VIH y VIH estudiadas.

PERFIL API ZYM	POBLACION NO- VIH	POBLACION VIH	TOTAL (%)
E1	1	2	3(4,7)
E4	1	2	3(4,7)
E5	0	2	2(3,2)
E6	6	0	5(7,9)
E8	0	1	1(1,6)
E10	8	16	24(38,1)
E11	1	1	2(3,2)
E12	0	6	6(9,5)
E13	2	0	2(3,2)
E14	1	0	1(1,6)
E16	0	6	6(9,5)
E17	1	2	3(4,7)
E18	0	1	1(1,6)
E19	1	1	2(3,2)
E21	0	2	2(3,2)
TOTAL (%)	22 (35)	41 (65)	63(100)

TABLA 57. Perfiles enzimáticos encontrados en las cepas de *C. albicans* aisladas de muestras orales en las poblaciones VIH y NO-VIH estudiadas.

PERFIL PSA	POBLACION NO-VIH	POBLACION VIH	TOTAL (%)
F1	2	2	6(9,5)
F2	1	2	3(4,7)
F3	2	1	3(4,7)
F4	2	2	4(6,3)
F5	0	7	7(11,1)
F6	0	6	6(9,5)
F7	5	9	14(22,2)
F9	0	1	1(1,6)
F10	0	1	1(1,6)
F12	6	0	6(9,5)
F14	3	9	9(12,3)
F15	1	0	1(1,6)
F19	0	2	2(3,2)
F48	0	1	1(1,6)
TOTAL (%)	22 (35)	41 (65)	63(100)

TABLA 58. Porcentajes de simplicidad global obtenidos para cada uno de los métodos así como las frecuencias relativas de cada uno de los parámetros considerados en la valoración de la simplicidad.

PARAMETROS	API	ZYM	RES	M1	M2	AST	PSA
No equipo especial	80	80	80	100	100	100	80
Facil preparación de reactivos	100	100	60	90	90	90	60
Estabilidad de productos	90	80	70	80	80	80	70
Sencillez de protocolo	90	90	70	80	80	70	70
Tiempo corto de realización	90	100	80	40	40	60	90
Facil interpretación	80	80	70	70	90	90	70
SIMPLICIDAD GLOBAL	88,3	88,3	71,7	76,6	80	81,3	73,3

TABLA 59. Valores de operatividad y eficacia encontrado en C. albicans para cada uno de los métodos de tipado estudiados.

METODO	EFICACIA			OPERATIVIDAD
	TIPABILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	DISCRIMINACION	SIMPLICIDAD
API 20C	100	87	40	88
API ZYM	100	84	81	88
RESISTO	100	70	89	72
MORFO I	100	50	86	80
MORFO II	100	94	75	77
AST	100	83	74	82
PSA	100	87	89	75

TABLA 60. Valores de operatividad y eficacia encontrados en C. tropicalis para cada uno de los métodos de tipado estudiados.

METODO	EFICACIA			OPERATIVIDAD
	TIPABILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	DISCRIMINACION	SIMPLICIDAD
API 20C	100	97	79	88
API ZYM	100	97	87	88
RESISTO	100	87	84	72
MORFO I	100	60	83	88
MORFO II	100	97	51	77
AST	100	84	94	82
PSA	100	84	97	73

TABLA 61. Valores de operatividad y eficacia encontrados en *C. parapsilosis* para cada uno de los métodos de tipado estudiados.

METODO	EFICACIA			OPERATIVIDAD
	TIPABILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	DISCRIMINACION	SIMPLICIDAD
API 20C	100	80	78	88
API ZYM	100	70	82	88
RESISTO	100	75	86	72
MORFO I	100	80	68	80
MORFO II	100	100	3	77
AST	100	75	85	82
PSA	100	75	69	73

TABLA 62. Valores de operatividad y eficacia encontrados en T. beigelii para cada uno de los métodos de tipado ensayados.

METODO	EFICACIA			OPERATIVIDAD
	TIPABILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	DISCRIMINACION	SIMPLICIDAD
API 20C	100	75	94	88
API ZYM	100	75	92	88
RESISTO	100	83	90	72
MORFO I	100	58	90	80
MORFO II	100	92	43	77
AST	100	93	79	82
PSA	100	83	88	73

TABLA 63. Valores de operatividad y eficacia encontrados en C. glabrata para cada uno de los métodos de tipado estudiados.

METODO	EFICACIA			OPERATIVIDAD
	TIPABILIDAD	REPRODUCIBILIDAD	DISCRIMINACION	SIMPLICIDAD
API 20C	100	83	31	88
API ZYM	100	100	58	88
RESISTO	100	83	86	72
MORFO I	100	67	0	80
MORFO II	100	100	0	77
AST	27	93	67	82
PSA	100	83	85	73

TABLA 64. Porcentaje de inercia (varianza) explicada al extraer dos factores del análisis de correspondencia para los 5 métodos estudiados.

METODO	ESP	API	ZYM	RESIS	MORFO	PSA
ZYM	CA	0,56				
	CT	0,53				
	CP	0,58				
	TB	0,24				
	CG	1*				
RESIS	CA	0,54	0,46			
	CT	0,41	0,39			
	CP	0,47	0,51			
	TB	0,45	0,46			
	CG	0,67	0,72			
MORFO II	CA	0,74	0,57	0,61		
	CT	0,95	0,84	0,57		
	CP	1*	1*	1*		
	TB	1	1	1		
	CG	0	0	0		
PSA	CA	0,61	0,37	0,40	0,67	
	CT	0,41	0,35	0,24	0,85	
	CP	0,62	0,5	0,43	1*	
	TB	0,39	0,4	0,48	1	
	CG	0,89	0,93	0,48	0	
AST	CA	0,55	0,57	0,46	0,58	0,37
	CT	0,72	0,63	0,53	0,88	0,63
	CP	0,62	0,54	0,52	1*	0,53
	TB	1*	0,54	1*	0	0
	CG	1*	1	0,9	0	1

* Porcentaje de varianza explicado con un sólo factor.

1 = correspondencia entre los dos métodos comparados.

0 = independencia entre los dos métodos comparados.

TABLA 65. Distancia entre biotipos cuantificada a 5 y 10 OTUs de distancia taxonómica para las especies más significativas.

ESPECIE	METODO	DISTANCIA	
		5 OTUs	10 OTUs
<u>C. albicans</u>	API 20C	4	2
	API ZYM	17	12
	RESIS	25	7
	AST	2	2
	PSA	13	5
<u>C. tropicalis</u>	API 20C	3	2
	API ZYM	17	11
	RESIS	21	8
	AST	2	2
	PSA	13	5
<u>C. parapsilosis</u>	API 20C	6	2
	API ZYM	16	9
	RESIS	13	6
	AST	4	2
	PSA	10	6
<u>T. beigeli</u>	API 20C	14	5
	API ZYM	9	6
	RESIS	9	5
	AST	3	2
	PSA	7	5
<u>C. glabrata</u>	API 20C	3	3
	API ZYM	6	4
	RESIS	8	6
	AST	5	4
	PSA	9	5

VI. DISCUSSION



1. FRECUENCIA DE LEVADURAS EN NUESTRO HOSPITAL

La frecuencia de micosis ha aumentado sustancialmente en los últimos años, principalmente por el uso de terapias agresivas. Además, hongos que antes se consideraban como contaminantes o simples colonizadores, ahora aparecen como patógenos humanos significativos, sobre todo en la población inmunocomprometida. Dada su elevada mortalidad (166), se hace necesario el desarrollo de medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento que eviten el continuo aumento de este grupo de patógenos. La posibilidad de encontrar un método que diferencie distintos tipos en los hongos aislados de pacientes con micosis, y que permitiera discriminar una colonización de una invasión (cepas virulentas), sería una herramienta poderosa para investigar la epidemiología de las infecciones fúngicas y su prevención (119).

A la vista de nuestros resultados de identificación de las levaduras aisladas en el Hospital Universitario de San Carlos, se puede ver como era de esperar, que la especie aislada en la mayoría de los casos fue C. albicans (43,2%), seguida a distancia considerable por C. tropicalis (14,5%) y C. parapsilosis (12,2%). En mucha menor proporción se aislaron C. glabrata (4,3%), C. guilliermondii (3,9%) y C. krusei (3%). En un estudio anterior con cepas aisladas en 1986 (28), C. albicans fue la especie más frecuente (62,6%), seguida de C. parapsilosis, y de C. tropicalis en tercer lugar.

Es difícil obtener datos sobre la incidencia de levaduras, porque hay pocas estadísticas globales. En España, Gatell y cols. (84), en 1988, estudiaron 543 episodios de bacteremia y fungemia y encontraron que Candida spp. era el quinto microorganismo aislado en frecuencia. Torres Rodríguez y cols. (288), en Barcelona, encontraron la siguiente frecuencia de especies de Candida aisladas: C. albicans (70%), C. tropicalis y C. glabrata (15%) y C. parapsilosis (8,5%). Hernández-Molina y cols. (100) encontraron la siguiente frecuencia de especies entre sus aislamientos: C. albicans (56,9%), C. parapsilosis (12,9%), C. guilliermondii (10,7%) y C. tropicalis (10,2%).

En Francia, Meunier-Carpentier (176), en un estudio sobre infección nosocomial, encontró como especies más frecuentes C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis y C. krusei. Los datos más representativos en USA los proporciona el Centro de Control de la Infección (CDC), a través del NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance). En 1984, de 26.965 infecciones, Candida spp. fue el octavo patógeno más común y representó el 5,5% de todos los aislamientos. La categoría de "otros hongos" se consideró el onceavo patógeno nosocomial más frecuente, representando el 1,7% de todos los aislamientos nosocomiales. Esta incidencia fue en aumento, como demostraban los datos NNIS del período 1980-1982 donde Candida

spp. representó el 4,5%, frente al 5,5% obtenido en el período 1983-1984 (304).

Banerjee (7) hizo un estudio de 25.000 casos de hemocultivos en un Hospital Universitario y encontró que un 6,5% de los cultivos positivos eran levaduras. En los 10 años que duró el estudio el índice de aislamiento de Candida sp. subió del 219 al 487%, siendo el segundo que más había aumentado después del estafilococo coagulasa negativo. En un estudio realizado por Wey y cols. (306) entre 1983-1986 en un Hospital Universitario, las levaduras representaron el 10% de los hemocultivos positivos. La incidencia de candidemia aumentó en USA entre 1977-1984 del 0,5 al 1,5 de cada 10.000 enfermos ingresados. En Canada, Roberts y cols. (246) realizaron un estudio de 1972 episodios de cultivos de sangre positivos que reveló un 5,9% de fungemias clínicamente significativas causadas por Candida.

En Africa, Badenhorst (4), encontró una frecuencia de aislamientos de levaduras en hemocultivo del 2,1%, siendo C. albicans la más frecuente en el 42%, seguido de C. tropicalis (25%) y C. parapsilosis (20%), datos bastante parecidos a los nuestros.

T. beigelii no es un microorganismo que se aísle con frecuencia, sin embargo en nuestro hospital se aisló en un 5,3%, porcentaje incluso superior al de C. glabrata que es una levadura de cierta relevancia.

C. neoformans, en España, no es una levadura frecuente, como demuestra el que haya sido aislada en un 2,3% de las muestras de levaduras positivas. Este porcentaje es mayor en los últimos años debido al aumento de la población inmunodeprimida que es susceptible a la infección por este microorganismo. En USA es el primer agente fúngico que afecta SNC entre los pacientes con SIDA y con neoplasias; un 5% de los pacientes con SIDA desarrollan infección criptocócica (281). En un estudio realizado en Carolina del Sur con 299 muestras de lugares contaminados por detritus de palomas, encontraron C. neoformans en el 45% (54).

El análisis estadístico de la incidencia de especies en cada origen anatómico estudiado nos revela la especie más frecuente en cada tipo de muestra. El resultado esperado sería que C. albicans fuera la más frecuente en todos los tipos de muestras ya que es la que se aísla casi en el 50% de los cultivos positivos. De acuerdo con lo esperado C. albicans fue la especie mayoritaria en todos los tipos de muestras estudiadas, pero con una excepción: en las muestras de piel y uñas C. parapsilosis fue la especie mayoritaria. En las muestras orales, profundas y orinas, C. tropicalis fue el segundo microorganismo aislado en frecuencia, mientras que en las muestras de origen genital C. glabrata fue la que siguió a C. albicans en importancia.

Si se analizan los porcentajes estadísticos de distribución de cada especie en los

diferentes nichos anatómicos se obtiene información de cual es la localización predilecta de cada una de las especies. C. albicans se distribuyó en todos los tipos de muestras de forma homogénea, aunque pareció mostrar cierta preferencia por las muestras orales. C. tropicalis se comportó de forma similar a C. albicans repartiéndose de forma parecida en los seis orígenes que se han considerado, mostrando algo de preferencia por la cavidad bucal. En el caso de C. glabrata se pudo demostrar que un 44,4% mostraba preferencia por las localizaciones genitales. La distribución de C. parapsilosis en los diferentes orígenes de dónde se aisló, nos reveló que en un 81,1% tendía a aislarse de muestras de piel y uñas. Algo parecido ocurrió con C. guilliermondii que en un 70,6% de los casos tendía a ser aislado de muestras superficiales. C. lusitanae demostró en un 44,4%, estar asociada a muestras de origen interno y ser causante por tanto de infecciones sistémicas. De modo similar, C. kefyr sólo fue aislada de muestras internas en el 66,6% o de muestras de orina en el 33,3%. Las restantes cepas de Candida aisladas de forma ocasional, se asociaron en un 71,4% a muestras superficiales, como era de esperar por su escasa virulencia, aunque hubo un 14% que se comportaron como cepas invasivas. Así mismo, todos los aislamientos de Rhodotorula que se encontraron se localizaron en piel. T. beigeli mostró preferencia por localizaciones superficiales en un 47,8%, pero en el 21,7% se asoció a infección de tejidos profundos.

La mayoría de las especies estudiadas cumplieron las características típicas del género y especie al que pertenecían, aunque en algunos casos se presentaron excepciones. En nuestro estudio el sistema API 20C AUX identificó correctamente el 95,4% de nuestros aislamientos. En tres aislamientos se identificó una especie que no estaba en la base de datos del sistema API.

Buesching (24) encontró que API 20C AUX identificaba correctamente el 96% de las 505 levaduras que utilizó en su estudio. Land (137) observó que API 20C identificaba correctamente el 97% de los aislamientos, comparado con un métodos convencional ayudado de la morfología microscópica. También encontró que las especies más frecuentes se identificaban correctamente en un 98%, mientras que si se trataba de especies como Cryptococcus, Trichosporon o Geotrichum se identificaban correctamente sólo el 90%. Ambos datos resultaron ser sumamente próximos a los obtenidos en nuestro estudio.

Hay que destacar que fue imprescindible el apoyo de la morfología microscópica en medio de agar corn-meal y la prueba de producción de tubo germinativo porque había especies que podían dar idéntico patrón de asimilación. Así por ejemplo se observó que en algún caso C. laurentii, C. guilliermondii y T. beigeli podían coincidir los códigos API, pero podían ser identificadas correctamente por su morfología microscópica característica. Lo mismo ocurrió con T. capitatum y algún aislamiento de C. krusei, y con C. famata y C. guilliermondii. Land (137) encontró, al igual que nosotros, problemas en la diferenciación

de algunas especies sin el apoyo de la morfología.

También se encontraron problemas en la identificación de algunos aislamientos de C. albicans y C. tropicalis si sólo se atendía al código obtenido por API, ya que la única prueba que los diferenciaba era la melezitosa. En nuestro caso encontramos dos C. albicans que resultaron ser melezitosa positivos y representaban un 1% de total. Estas fueron identificadas incorrectamente como C. tropicalis por el sistema API. De modo similar se encontraron dos C. tropicalis melezitosa negativos, que el sistema API identificó como C. albicans y representó el 1.6% de los aislamientos de dicha especie. En ambos casos la especie se identificó correctamente con los resultados de producción de tubo germinativo y producción de clamidosporas en medio CM. Syverson (284) encontró el mismo problema que nosotros obteniendo un 3% de C. albicans que el API identificaba como C. tropicalis. Land (137) encontró un 2% de C. albicans que asimilaban melezitosa. El sistema API indicaba en sus valores de melezitosa la posibilidad de encontrar el 4% frente al 1% que encontramos nosotros para C. albicans. Este pequeño porcentaje de error se resolvía fácilmente realizando la detección de tubo germinativo y la producción de clamidosporas.

Existía también desacuerdo en cuanto a la asimilación de celobiosa en C. albicans y C. tropicalis. Según Syverson (284) ninguno de sus aislamientos de C. albicans asimilaba celobiosa, mientras que sí lo hacían las cepas de C. tropicalis. El sistema API indicaba un 0% de asimilación en C. albicans, en acuerdo por la teoría de Syverson, pero sólo un 24% en C. tropicalis, por tanto en desacuerdo. Nuestros resultados revelaron una diferencia entre ambas especies para la celobiosa aún menor, ya que en C. albicans fue del 0% y en C. tropicalis del 11%. Esto hace que dicho azúcar no tenga valor para discriminar entre las dos especies.

La arabinosa ayudaba a diferenciar C. parapsilosis que era positiva, de C. albicans y C. tropicalis que eran negativas según Land. El sistema API indicaba que un 2% de C. albicans podían asimilarlo y que un 4% de C. parapsilosis no podían. Los datos obtenidos en este estudio indicaron que un 6% de las cepas de C. albicans y un 15% de las de C. tropicalis podían asimilar arabinosa, frente a un 93% de las de C. parapsilosis. De modo similar, según Land (137) la arabinosa no debía ser asimilada por C. neoformans, sin embargo, la asimilaron el 12% de las cepas estudiadas. El sistema API indicaba hasta un 24% de aislamientos de C. neoformans que podían asimilar arabinosa. En nuestro estudio este valor fue aún más alto, encontrando un 40% de asimilación. Land también indicó que un 14% de los C. neoformans asimilaban xilitol, mientras el sistema API proponía sólo un 1%. Nuestros resultados estuvieron más de acuerdo con los sugeridos por Land ya que obtuvimos un 20% entre nuestros aislamientos. Parte de estos problemas se solucionaron haciendo la prueba de la fenol oxidasa.

En la determinación de la producción de tubo germinativo como prueba complementaria en la identificación de C. albicans encontramos un 96,3% de positividad. Syverson (284) señaló que un 96% de los aislamientos clínicos de C. albicans producían tubo germinativo y él mismo en observó un 96,7% entre sus aislamientos. Por el contrario Hellyar (99) encontró que el 100% de sus 250 aislamientos de C. albicans producían tubo germinativo y clamidosporas. Así mismo, Syverson hizo referencia a que C. tropicalis en determinadas circunstancias podía producir también tubo germinativo y clamidosporas. En este estudio se observó que algunos aislamientos frescos de C. tropicalis producían tubo germinativo, pero perdieron esta capacidad cuando se mantuvieron en cultivo. En nuestra experiencia no encontramos ningún aislamientos de C. tropicalis productor de clamidosporas que Syverson sí mencionaba. Schlitzer (265) en acuerdo con nuestros resultados encontró algunos aislamientos de C. tropicalis que producían tubo germinativo y observó que en ocasiones las pseudohifas podían confundirse con tubos germinativos.

La valoración de los porcentajes de crecimiento en placas comerciales de Sabouraud que contenían cicloheximida, nos reveló que no todas las levaduras patógenas crecían en este medio. Hay levaduras que pueden ser patógenos importantes por su resistencia, como ocurre con C. lusitane, o que sean las causantes de una infección y que no crezcan por ser inhibidas por la cicloheximida (199,243,263). En nuestro estudio todos los aislamientos de C. albicans crecieron bien en medio con cicloheximida (actidiona), sin embargo patógenos como C. tropicalis sólo lo hicieron en un 50%, sólo un 10% de C. parapsilosis lo hacían, el resto no crecían o lo hacían mal. Los aislamientos de C. glabrata no eran capaces de crecer en medios con actidiona.

2. SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS

La determinación de la susceptibilidad de las levaduras a los diferentes antifúngicos plantea numerosos problemas debido a la falta de un método estandarizado como el que existe para las bacterias. La bibliografía consultada utilizaba diferentes técnicas y una gran variedad de medios (59,66,100,249). Por este motivo analizamos en nuestro laboratorio los medios y métodos más recomendados y elegimos el que nos pareció más sencillo de realizar y permitía una mejor lectura de los resultados. Rotowa en colaboración con Shadomy en 1990 (249) utilizaron, coincidiendo con nosotros, la técnica de dilución en agar, empleando replicador de Steer's y haciendo recuento de colonias en placa de cada una de las suspensiones empleadas para comprobar el número de células que llevaba cada dilución.

La determinación de la susceptibilidad para los polienos no planteó demasiados

problemas. La determinación de la CMI resultó relativamente fácil en todos los casos, obteniéndose pocas variaciones si se modificaba el tamaño del inóculo o la composición del medio. Además, mostró una gran reproducibilidad. Los imidazoles, en cambio, parecían tener una irreproducibilidad inherente a las pruebas de susceptibilidad, como ya señalaba Odds en su libro "Candida y candidosis" (199). Este problema ha ido aumentando desde los derivados tópicos como el miconazol o el clotrimazol hasta los triazoles orales más modernos como son el fluconazol e itraconazol. Rotowa (249) también comentó la dificultad de elegir la CMI en el caso de imidazoles y triazoles.

Los imidazoles parecen ser dependientes del tiempo de lectura porque como actúan fundamentalmente sobre la pared, el mayor efecto inhibitorio se produce durante la fase de crecimiento logarítmico, mientras que en el crecimiento estacionario este efecto sería mínimo. Los polienos no plantean este problema porque la anfotericina B se une covalentemente a la pared, ejerciendo directamente su acción ya que las variaciones en los resultados no dependen de las características de crecimiento de los microorganismos (199). Cuando se trataba de la interpretación de la CMI de los azoles surgían problemas para encontrar donde estaba el punto de corte, ya que las levaduras comenzaban a inhibirse pero no desaparecerían a lo largo de muchas diluciones. El criterio clásico de elegir la CMI en el punto donde se deja de observar crecimiento visible no servía en el caso de las levaduras y los imidazoles. El criterio que se siguió en este estudio, coincidió con la idea más extendida actualmente de elegir el punto de corte cuando se inhibe el crecimiento en un 70-75% respecto al control positivo de crecimiento (3,219).

No existía tampoco acuerdo en la definición de la CMI donde una levadura se consideraba resistente a los imidazoles. Shadomy (269) consideró que un aislamiento era sensible a anfotericina B cuando daba una CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$, mostraba una sensibilidad intermedia con CMI entre 2-4 $\mu\text{g/ml}$ y era resistente cuando la CMI = 8 $\mu\text{g/ml}$ o superior. Torres Rodríguez (288) consideró el mismo criterio al considerar un aislamiento resistente a partir de CMI > 4 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo Rotowa en colaboración con Shadomy (249) situaron la resistencia a anfotericina B valores de CMI = 32 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, el pico máximo que alcanzaba la anfotericina B en suero oscila entre 1.5-2 $\mu\text{g/ml}$ según Brass (18) y entre 2-3 $\mu\text{g/ml}$ según Odds (199).

En nuestro estudio sólo hemos encontrado un aislamiento claramente resistente en C. albicans con una CMI = 64 $\mu\text{g/ml}$ que representó una resistencia del 0,5%. Torres Rodríguez (288) en su estudio de resistencias a anfotericina B en la comunidad catalana encontró un 7,8% de resistencias a anfotericina B, más alto por tanto del valor encontrado entre las C. albicans de nuestro hospital. El resto de aislamientos de C. albicans mostraron una CMI

menor de 2 $\mu\text{g/ml}$ con lo cual tampoco encontraron resistencias intermedias. Korting (128) encontró unos rangos de sensibilidad en C. albicans para anfotericina B entre 1,3-2,3 $\mu\text{g/ml}$ y Lorian (149) encontró valores entre 0,05-4 $\mu\text{g/ml}$, siendo ambos aproximadamente parecidos a los nuestros.

Sólo otras dos especies de levaduras mostraron resistencia a anfotericina B: C. lusitaniae con un aislamiento que dio una CMI = 32 $\mu\text{g/ml}$ (11,1% de resistencia), mostrando el resto de aislamientos una CMI de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ o menores; y T. beigelii con tres aislamientos que dieron unas CMIs entre 32-64 $\mu\text{g/ml}$ (13% de resistencia) y una cepa que podría considerarse de sensibilidad intermedia con una CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$ (4,3%). El resto de los aislamientos de T. beigelii dieron CMIs de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ o menores. Estos datos coinciden con los de Rotowa que encontró en T. beigelii una CMI_{90} = 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y aproximadamente similares a los datos obtenidos por Lorian para C. lusitaniae con CMIs entre 0,39-50 $\mu\text{g/ml}$ (249). Rotowa en sus estudios de sensibilidad a anfotericina B incluyó el mismo control que nosotros y obtuvo al igual que nosotros una CMI para C. kefir ATCC 28838 de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (249).

En C. tropicalis sólo encontramos un aislamiento que podría considerarse de resistencia intermedia con CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$ (1,6% de resistencia) y el resto de las cepas mostraron CMIs de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ o menores. Lorian (149) encontró valores de CMI a C. tropicalis más elevados, que oscilaron entre 0,04-16 $\mu\text{g/ml}$.

Todos nuestros aislamientos de C. neoformans fueron muy sensibles a anfotericina B con CMIs de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ o menores. Lorian (149) encontró, en este caso, valores más elevados con rangos de CMIs entre 0,04-2,8 $\mu\text{g/ml}$.

En general nuestros datos estuvieron de acuerdo con la idea de Odds (199) de que las CMIs a anfotericina B debían ser como mucho de 3 $\mu\text{g/ml}$. Las resistencias a anfotericina B son excepcionales salvo en determinados casos o determinadas especies como C. lusitaniae, donde se han descrito algunas resistencias. Llegó a la conclusión que una CMI mayor de 3 $\mu\text{g/ml}$ debía analizarse con cuidado porque podía tratarse de un falso positivo.

En el caso del miconazol, Shadomy (269) consideró que un aislamiento era sensible si su CMI era de 8 $\mu\text{g/ml}$ o menor, pero no indicó dónde establecer la resistencia. El miconazol alcanzaba picos en suero entre 5-7 $\mu\text{g/ml}$ según Brass (18) y entre el 2-3 $\mu\text{g/ml}$ según Odds (199). La mayoría de los autores encontraron CMIs para miconazol que oscilaron entre 0,1 y 25 $\mu\text{g/ml}$.

En nuestro estudio todos los aislamientos de C. albicans fueron inhibidos a

concentraciones de miconazol de 2 $\mu\text{g/ml}$ o menores, salvo un aislamiento que dio una CMI = 256 $\mu\text{g/ml}$ y se consideró resistente (0,5% de resistencia).

En C. tropicalis encontramos dos aislamientos con una CMI = 64 $\mu\text{g/ml}$ que consideramos como resistentes (3,2%) ya que el resto de los aislamientos mostraron unas CMIs de 8 $\mu\text{g/ml}$ o inferiores.

En T. beigelii encontramos un 4,3% de resistencias debido a un aislamiento con CMI = 256 $\mu\text{g/ml}$, siendo el resto de las CMIs de 8 $\mu\text{g/ml}$ en un caso y de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ o menores en el resto de los aislamientos. El resto de las especies se inhibieron a concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

Fromtling (73) encontró una CMI₅₀ para miconazol de 2 $\mu\text{g/ml}$ y una CMI₉₀ de 4 $\mu\text{g/ml}$, lo cual resultó ligeramente por encima de los resultados obtenidos en nuestro caso que fueron de 0,25 y 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Según los resultados obtenidos con nuestro método, para el miconazol, una CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$ sería considerada como intermedia porque no es la CMI que presenta el 90% de los aislamientos sino que forma un hombro en la curva de sensibilidad.

En el caso del econazol la mayoría de los autores indicaron CMIs de alrededor de 25 $\mu\text{g/ml}$ (149,199). En nuestro estudio todos los aislamientos fueron inhibidos a concentraciones de econazol de 4 $\mu\text{g/ml}$ o menores, excepto un aislamiento de T. beigelii que mostró una CMI = 8 $\mu\text{g/ml}$ y otro una CMI = 64 $\mu\text{g/ml}$. Así pues parece ser que la sensibilidad a econazol en nuestro hospital y con el método empleado resultó de 2-3 diluciones por debajo de los valores obtenidos por estudios norteamericanos.

Para el ketoconazol, Odds (199) indicó CMIs que oscilaban entre < 1 y 20 $\mu\text{g/ml}$ pero que no era raro encontrar valores superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$. Rotowa (249) consideró resistencia a ketoconazol para concentraciones de 128 $\mu\text{g/ml}$ o mayores, utilizando nuestro mismo método y nuestro mismo medio.

En el presente trabajo encontramos que la CMI₅₀ del ketoconazol en C. albicans estuvo en 4 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI₉₀ en 8 $\mu\text{g/ml}$. Hubo un 5,8% de aislamientos con CMIs entre 32- > 256 $\mu\text{g/ml}$, que se salían de la curva de sensibilidad general para C. albicans y que consideramos de resistencia intermedia a resistentes porque marcaban un hombro en la curva. En el caso de C. tropicalis encontramos un 6,3% de aislamientos con CMIs de 32 $\mu\text{g/ml}$ o superiores, de los cuales el 3,1% tuvieron CMIs de 128 $\mu\text{g/ml}$ o mayores, frente al resto de la población que se inhibía a concentraciones menores de 16 $\mu\text{g/ml}$. En C. lusitane encontramos un 33,3% de aislamientos que eran inhibidos a concentraciones de ketoconazol de 0,25 $\mu\text{g/ml}$

o menores, mientras que un 22% requería una concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ y el 44,4% restante necesitaron concentraciones de 128 $\mu\text{g/ml}$ o superiores para inhibirse.

Según nuestros datos parece ser que en el caso del ketoconazol una CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$ ya no es común al 90% de la población porque marca un hombro en la curva de sensibilidad lo cual es un indicio de cierta resistencia. Fromtling (73) obtuvo para el ketoconazol una $\text{CMI}_{50} = 32 \mu\text{g/ml}$ para C. albicans y una CMI_{90} de 128 $\mu\text{g/ml}$ o mayor. El citado autor señalaba que el medio YMA no era bueno frente a imidazoles porque daba CMIs elevadas. Sin embargo nuestras CMIs resultaron 2-3 diluciones por debajo de las suyas. Por el contrario Korting (129) encontró que sus C. albicans tenían una CMI a ketoconazol de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y Rogers (248) obtuvo una CMI_{90} de 0,031 $\mu\text{g/ml}$, ambos resultados difieren en 3-7 diluciones por debajo de nuestros resultados. Lorian (149) encontró CMIs para C. albicans de valores superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Esta variación tan grande observada entre los valores de CMI a ketoconazol encontrados por los diferentes autores ya lo comentó Odds (199), el cual encontró diferencias superiores a 1000 diluciones entre los datos obtenidos por diferentes autores que empleaban diversos métodos y medios.

Para el clotrimazol la mayoría de los autores encontraron CMIs desde < 1 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$. En nuestro estudio encontramos que los 435 aislamientos estudiados fueron inhibidos por concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ o menores. Cabe destacar que mientras la mayoría de las especies incluidas C. albicans y C. tropicalis mostraban CMI_{50} de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, C. lusitaniae daba una CMI_{50} de 4 $\mu\text{g/ml}$. Lorian (149) encontró los mismos valores para C. lusitaniae pero también observó aislamientos de C. albicans con CMIs de hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ y de alrededor de 4 $\mu\text{g/ml}$ en C. tropicalis.

El fluconazol en nuestro estudio mostró ser bastante inactivo "in vitro" bajo nuestras condiciones de estudio. Esta discrepancia entre la baja actividad "in vitro" y su demostrada buena actividad "in vivo" ha sido señalada por otros autores que usaron fluconazol en varios modelos animales (224). Lo mismo le ocurrió a Van't Wout (293) que no encontró mucho efecto del fluconazol "in vitro" sobre el crecimiento de C. albicans, incluso a concentraciones mayores de 100 $\mu\text{g/ml}$, aunque sí le daba buenos resultados "in vivo". Dicho autor comprobó ésto en tres medios y en todos encontró resultados similares.

Galgiani (81) hizo una revisión de los problemas encontrados por él y otros autores en la determinación de la susceptibilidad "in vitro" a fluconazol. Encontró que los resultados se podían ver alterados por el pH, inóculo y composición del medio, pero al correlacionarlo con los resultados obtenidos "in vivo" se veía que las cepas más resistentes "in vitro"

causaban las infecciones menos sensibles a fluconazol por lo que sí había cierta correlación. Las CMI's tan elevadas del fluconazol en medios sólidos y semisólidos que no se correlacionaban con los experimentos "in vivo" podían ser debidas a que el fluconazol quedara atrapado en la malla de agar y no difundiera bien para ejercer su efecto.

Marriot y Richardson (240) con un medio muy definido encontraron para Candida y Cryptococcus CMI's de 0,19-1,9 $\mu\text{g/ml}$, menos para C. krusei donde observaron CMI's superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$. Hughes y Beggs (8,111) encontraron CMI₅₀ entre 0,2 y 16 $\mu\text{g/ml}$. Ambos observaron más efecto inhibitorio que letal del fluconazol sobre Candida sp.

Odds (205) en un estudio comparando dos medios encontró que en el medio complejo la CMI era $> 100 \mu\text{g/ml}$ y en el medio definido la CMI era 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Rogers (248) con otro medio diferente en caldo encontró una CMI₉₀ = 0,25 $\mu\text{g/ml}$, pero a pesar de las discrepancias encontraba correlación con los resultados "in vivo". Troke (290) reveló la baja actividad "in vitro" del fluconazol, menor que para ketoconazol, que no coincidía con la buena eficacia que manifestaba en clínica. En un experimento animal de candidiasis vaginal en ratones mostró que a pesar de ser "in vitro" 80 diluciones menos activo que el ketoconazol, era 15 veces más potente "in vivo" frente a la infección.

Según nuestros datos experimentales el rango de susceptibilidad del fluconazol a la mayoría de las especies osciló desde valores menores a 0,03 $\mu\text{g/ml}$ hasta valores superiores a 256 $\mu\text{g/ml}$, como ya indicaba Odds (205). C. albicans y C. tropicalis tuvieron un comportamiento similar frente a fluconazol dando una CMI₅₀ = 128 $\mu\text{g/ml}$ y una CMI₉₀ $> 256 \mu\text{g/ml}$. C. parapsilosis en cambio tuvo una CMI₉₀ = 1 $\mu\text{g/ml}$ y C. neoformans mostró una CMI₅₀ = 0.06 $\mu\text{g/ml}$ y una CMI₉₀ = 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

La sensibilidad a ciclopirox olamida fue bastante homogénea inhibiéndose la mayoría de los aislamientos a concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ o menores, salvo C. albicans, C. lusitaniae y T. beigelii que los hicieron a 4 $\mu\text{g/ml}$ o menos. C. lusitaniae mostró la CMI₉₀ más elevada de las especies estudiadas siendo de 4 $\mu\text{g/ml}$. C. neoformans se mostró muy sensible a ciclopirox con CMI₅₀ = CMI₉₀ = 0.06 $\mu\text{g/ml}$.

En presencia de extracto de ajo las levaduras estudiadas fueron inhibidas en su mayoría entre concentraciones equivalentes a una dilución de ajo de 1/640-1/1280. C. neoformans, T. beigelii, G. candidum y S. cerevisiae lo hicieron a una dilución 1/320. Louria en 1989 (150) comprobó también la capacidad antifúngica del ajo y encontró que una dilución 1/128 inhibía el crecimiento de C. neoformans. Es interesante reseñar que el ajo fue licuado para incorporarlo a las placas en una licuadora limpia y seca sin guardar más condiciones de esterilidad, de forma que el ajo fue capaz de inhibir no sólo el crecimiento de las levaduras

ensayadas sino toda la flora microbiana ambiental tanto de bacterias como de hongos levaduriformes o filamentosos. A las concentraciones que nosotros leímos las CMI, las placas estaban sin ninguna contaminación de fondo.

Odds dedicó un espacio en su libro (199) a la mención de las propiedades antifúngicas de la alina del ajo que se conocían desde 1944. También indica que incluso se han obtenido alinas sintéticas pero como la opinión general lo consideraba un tratamiento heterodoxo de las micosis no se había avanzado en su estudio. Clayton, en su libro "Thrush" editado en 1984 (199), describió el uso del ajo para el tratamiento de la candidiasis vaginal.

3. TIPACION POR SISTEMA API 20C AUX

Entre los 188 aislamientos de C. albicans que hemos analizado, hubo 10 biotipos. El 76,6% mostraron 2576174 como biotipo mayoritario, seguido de 2556174 en el 6,9%, 2776174 en el 4,8% y 2566174 en el 3,7%. Comparando nuestros datos con los recogidos en la literatura encontramos que Williamson (307) observó también como biotipo mayoritario 2576174 en el 74,6%, 2566174 en el 11,5% (en nuestro caso 3,7%), 2572174 en el 3,1 (1,1% en nuestro caso) y 6576174 en el 2,3% (2,7% en nuestro caso). Williamson pues, encontró unas frecuencias parecidas a las nuestras y unos biotipos similares al menos entre los biotipos mayoritarios. Entre los biotipos minoritarios encontramos algunas discrepancias ya que él encontró un aislamiento que no asimilaba N-acetil-glucosamina, otro que no asimilaba la sacarosa y otro que no asimilaba trehalosa que en nuestro caso no encontramos.

Korting (129), encontró también como biotipo mayoritario 2576174 en el 63,9%, pero descubrió en un 21,3% tres biotipos que no encontró Williamson, aunque no indicó cuales eran. Al igual que nosotros no encontró los biotipos minoritarios antes mencionados. En adicción a los 13 biotipos encontrados por Williamson, nosotros encontramos tres biotipos que él no describía: 2174174 (0,5%), 2546174 (1,6%) y 6776174 (1,1%). Hellyar (99) encontró nuestro mismo biotipo mayoritario en un 60% de sus aislamientos de C. albicans. En segundo lugar encontró el biotipo 2176174 en un 14% y en un 8% otros biotipos minoritarios que nosotros no encontramos y Williamson tampoco. Williamson (308) observó en C. albicans 11 azúcares con variabilidad: glicerol, arabinosa, xilosa, adonitol, xilitol, metilDglucosidasa, Nacetilglucosamina, sorbitol, sacarosa, trehalosa y melizitosa. Nosotros solamente 8: glicerol, arabinosa, xilosa, adonitol, xilitol, sorbitol, metil-D-glucosidasa y melizitosa. No hemos encontrado ningún estudio bibliográfico de cómo se distribuyen los biotipos API 20C en las distintas áreas anatómicas.

O'day (192) utilizó este método para tipificar los aislamientos de un brote epidémico causado por C. parapsilopsis. Encontró un único biotipo 6756171, biotipo que por otro lado resultó ser el más frecuente que hemos encontrado entre los aislamientos de C. parapsilopsis de este estudio, lo que podría indicar su ubicuidad. En este estudio, no se encontró ningún tipo de asociación entre un biotipo particular y una determinada área anatómica entre las especies analizadas.

El tiempo de lectura resultó crítico en la utilización del API 20C como método de biotipado. En nuestro estudio la lectura siempre se realizó a las 48 horas salvo en algún caso excepcional que no creció suficiente y se dejaron hasta 72 horas. No se valoró la lectura a 24 h, porque se encontraban más variaciones que cuando se leían a 48h. Hellyar (99) obtuvo la misma conclusión después de evaluar sus datos.

4. BIOTIPADO CON SISTEMA API ZYM

Hemos encontrado desacuerdo en la bibliografía en la selección de enzimas de la galería API ZYM para la determinación de los distintos biotipos. Así por ejemplo Williamson (307) utilizó sólo 4 enzimas para identificar los biotipos de 213 aislamientos orales de C. albicans: valina arilamidasa, naftol-fosfohidrolasa, α glucosidasa, N-acetil-glucosaminidasa. Con estas enzimas encontró ocho biotipos que denominó de la A a la H. En cambio para detectar los distintos biotipos de C. tropicalis empleó cinco enzimas: valina arilamidasa, naftol-fosfohidrolasa, α glucosidasa, β glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa, encontrando así 7 biotipos para C. tropicalis que denominó con letras de la A a la G. Posteriormente, estudió 130 aislamientos de C. albicans (308) y en esta ocasión eligió como enzimas discriminatorias de biotipos las cuatro anteriores, más la enzima β glucosidasa. El grupo de Casal (42) utilizaba también cuatro enzimas para determinar sus biotipos, pero una de ellas era diferente: valina arilamidasa, cistina arilamidasa, α glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa, encontrando con este criterio ocho biotipos que codificaron de la A-H, las mismas letras de los autores anteriores pero los biotipos no coincidían. Casal encontró un 23,69% de variación en la enzima β glucosidasa que Williamson no utilizó en su criterio de tipación. Por otro lado, Williamson encontró un 3,9% de actividad enzimática naftol-fosfohidrolasa que Casal no consideró en su estudio de tipado. De igual modo Williamson (308) observó un 16,9% de actividad enzimática β glucosidasa que no consideró en estudios anteriores. Para dicha enzima Casal encontró un 2% de actividad β glucosidasa que no utilizó en su análisis de biotipos.

En este estudio incluimos enzimas que estaban presentes en un porcentaje muy bajo pero que ayudaban a diferenciar un aislamiento de otro y que en nuestro caso para alguna

especie en particular, resultó bastante alto. Williamson utilizaba como enzimas críticas la actividad valina-arilamidasa que estaba presente en sólo un 0,8% y la actividad naftol-fosfohidrolasa que estaba presente en el 3,9% de sus aislamientos.

Con el criterio utilizado en el presente estudio para la determinación de perfiles enzimáticos con la galería API ZYM se encontraron 19 biotipos en C. albicans, 15 en C. tropicalis, 13 en C. parapsilosis, 14 en T. beigelii y 5 en T. glabrata.

El perfil E10 representó el 37,8% de los aislamientos de C. albicans. Un aislamiento de C. albicans procedente de hemocultivo no producía enzima fosfatasa ácida. Dos cepas de C. albicans tampoco producían enzima naftol-fosfohidrolasa siendo una procedente de exudado genital y otra de orina. La actividad enzimática α manosidasa estuvo presente en 2 cepas de C. albicans procedentes de muestras orofaríngeas de enfermos VIH. Williamson (308) encontró que el 92,2% de los biotipos de C. albicans producían enzima valina arilamidasa, que en nuestro caso fue del 98,9% y para Casal (42) de 78%. Así mismo, Williamson encontró un 3,9% de éstos, que no producían enzima naftol-fosfohidrolasa, mientras que en nuestro caso fue del 1% y Casal (42) no observó ninguno. También encontró un 96,9% de aislamientos de C. albicans productores de enzima α glucosidasa, de acuerdo con nuestros datos que indicaron un 94,7% y en desacuerdo con Casal que sólo encontraba un 59%.

Para la enzima α glucosidasa Williamson encontró el 19,9% de aislamientos productores, que también concordaba con nuestro valor del 12,8%, y discrepaba de los resultados de Casal que encontraba sólo un 2%. La actividad N-acetil-glucosaminidasa fue activa en un 91,1% de las cepas de C. albicans estudiadas por Williamson, similar al valor obtenido por nosotros (86,2%) y por Casal (69%). En 1986, Williamson no encontró actividad enzimática β -glucosidasa entre los 213 aislamientos de C. albicans que estudia. Comparando los resultados actuales con un estudio preliminar que realizamos en 1990 (36) con 81 aislamientos de C. albicans no encontramos grandes variaciones, salvo un aumento en la actividad cistina arilamidasa del 50% a 75%, en la actividad α glucosidasa del 37% al 94% y en la actividad N-acetil-glucosaminidasa del 50% al 86,2%.

El biotipo mayoritario de C. albicans coincidió con el biotipo mayoritario de C. tropicalis, aunque la β galactosidasa la producía C. tropicalis en mayor proporción que C. albicans. El hecho de que compartan el perfil enzimático no es de extrañar teniendo en cuenta la proximidad taxonómica y además, que comparten muchas otras características como poseer idéntico número de coenzima Q y similares porcentajes de G+C (243).

Dos C. tropicalis no producían enzima naftol-fosfohidrolasa, una de muestra genital

y otra de un hemocultivo. En un estudio que realizó Williamson (307) con 62 aislamientos de C. tropicalis encontró 91.4% productores de enzima valina arilamidasa, coincidiendo con nuestro resultado del 95.2%. La enzima naftol-fosfohidrolasa la producían un 87.1%, siendo del 96.8% entre nuestros aislamientos. La enzima α glucosidasa era producida en su caso en un 91.1%, coincidiendo con el 95.2% en el nuestro. Para la enzima β glucosidasa los resultados discreparon, Williamson encontró un 25,8% y nosotros un 73% de actividad. Para la enzima N-acetil-glucosaminidasa este autor encontró un 77.4% de productores, valor cercano a nuestro, 63.55%.

Entre las actividades atípicas que se encontraron en este estudio destaca, que el 100% de las cepas de C. pseudotropicalis (C. kefyr), producían enzima β galactosidasa incluida la C. kefyr ATCC 28838, al igual que ocho de los 23 T. beigelii, siendo cuatro de dichos aislamientos procedentes de muestras internas. Dos cepas de C. famata también producían enzima β galactosidasa que procedía de una muestra de uña y de otra invasiva. En C. neoformans, siete de las diez cepas producían enzima β glucuronidasa. Un C. laurentii producía enzima α galactosidasa. Una C. glabrata no producía enzima naftol-fosfohidrolasa y procedía de un exudado genital. Dos C. pelliculosa (H. anomala) tampoco producían enzima naftol-fosfohidrolasa, ambas procedentes de muestras de uñas. Una C. guilliermondii aislada de pies tampoco producía enzima naftol-fosfohidrolasa. Casal (42) no encontró ningún aislamiento entre sus 186 cepas de C. albicans y cuatro de C. tropicalis que no produjeran dicha enzima. En cambio sí encontró dos cepas de C. glabrata que no la producían. La actividad enzimática α manosidasa estuvo presente en un C. laurentii aislado de heces, un C. lusitaniae procedente de hemocultivo, una C. parapsilosis aislada de orina y dos C. albicans procedentes de muestras orofaríngeas de enfermos HIV. Por otro lado, Casal no encontró esta actividad en las especies mencionadas por nosotros, pero sí la encontró en un C. neoformans, una C. glabrata, y un S. carlsbergensis. Casal (42) encontró un aislamiento de C. guilliermondii productor de enzima α fucosidasa que nosotros no encontramos. Nuestros resultados estuvieron de acuerdo con Casal en que C. glabrata producía fosfatasa ácida, dato que discrepaba con los obtenidos por Bobey (10). Casal coincidiendo con nosotros encontró actividad β galactosidasa en C. kefyr, discrepando de la opinión de Bobey (10), que no encontró dicha actividad.

También observamos al igual que Casal (42) que el reactivo zym B era muy sensible a la luz y la temperatura ambiente cambiando de su color amarillo original a naranja, por lo cual una vez preparado lo manteníamos envuelto en papel de aluminio y en nevera. El sistema resultó extremadamente cómodo ya que por ser un sistema comercial no necesitaba preparación previa de reactivos. Además resultó una técnica muy rápida ya que en cuatro horas podíamos hacer la lectura. No encontramos variaciones en la lectura realizada a 4-6 horas, y las actividades después de ser reveladas se seguían leyendo correctamente durante

24-48 horas, si se mantenían en su cámara húmeda y en nevera.

Como método de tipado, el perfil de enzimas hidrolíticas permite el estudio epidemiológico de las infecciones por levaduras de interés clínico en la rutina del laboratorio de microbiología. El usar métodos comerciales hace que las técnicas de tipado sean más reproducibles al evitar las irregularidades en la preparación de los medios y reactivos en los diferentes centros. La prueba mejoraría si se le incorporaran algunas enzimas importantes como la actividad proteinasa o fosfoamidasa.

5. RESISTOTIPADO

Huben (110) encontró una resistencia a 5FC entre cepas de C. albicans del 29,7%, utilizando discos de 10 $\mu\text{g/ml}$, valores superiores a los nuestros porque empleó una concentración inferior. Odds (193) empleando concentraciones de 200 $\mu\text{g/ml}$ de 5FC, observó un 8,7% de resistencia. Cuando estudió comparativamente los resultados entre un grupo de cultivos almacenados y otro de aislamientos de C. albicans frescos, encontró que en los primeros la resistencia era de sólo el 5% mientras que entre los frescos era del 15,6%. En nuestro estudio encontramos un 9% de resistencia a 250 $\mu\text{g/ml}$ de 5FC en C. albicans y hasta un 56,5% en T. beigelii.

En el caso de la urea, Odds encontró que el 70% de los cultivos viejos de C. albicans eran capaces de asimilarla, mientras que los cultivos frescos lo hacían en un 81,3% (media 73,9%). En este trabajo los porcentajes fueron muy inferiores, encontrando el 0% en especies como C. albicans y C. parapsilosis, el 1,6% en C. tropicalis, el 5,6% en C. glabrata y el un 8,7% en T. beigelii. Para el ácido bórico, Williamson (308) encontró que el 48% de los 130 aislamientos de C. albicans que ensayó eran resistentes. Nosotros, siguiendo su misma técnica encontramos un 66,5% entre las C. albicans ensayadas.

Hunter (112) en un análisis realizado con 90 cepas de C. albicans procedentes de exudados vaginales y 109 procedentes de heces encontró resistencias a ácido bórico del 31,1% y de 37,6% respectivamente. En este estudio se encontraron valores del 43,5% y del 63%, sensiblemente más resistentes que puede coincidir con la idea de Odds de la existencia de diferentes biotipos en las distintas áreas geográficas (196).

Para la prueba de la tolerancia a sal, Odds (193) encontró un 86,7% de resistentes entre sus cultivos guardados y un 84,5% entre los aislamientos frescos. En nuestro estudio utilizamos una concentración de sal más elevada, que tuviera mayor capacidad de

discriminación entre aislamientos, y encontramos que un 12,8% de los aislamientos de C. albicans eran capaces de resistir una concentración del 11% de ClNa, siendo mayor en el caso de C. glabrata que lo hizo en un 33,3% de las cepas y por el contrario ningún aislamiento de T. beigeli resistió dicha concentración.

Para la prueba del citrato encontramos, que era utilizado por un 72,8% de las cepas de C. albicans y sólo por un 11,1% de los aislamientos de C. glabrata. Odds (193) encontró que el citrato era asimilado por un 65% de los cultivos almacenados y por el 78,1% de los aislamientos frescos. Amalia del Palacio en 1987 (209), estudió los biotipos de las C. albicans procedentes de de adictos y encontró un 100% de resistencia a citrato, siendo un 67% de un biotipo determinado. Esto indicaría que un biotipo determinado podría crecer mejor, en el limón que los adictos utilizan para preparar la heroína y se consideró como foco de infección. El que todos los aislamientos fueran resistentes a citrato indicaría la capacidad de la levadura para crecer en el limón a pH bajo.

Con el método de resistotipado de Warnock, Ghannoum (85) encontró siete biotipos diferentes entre las 54 C. albicans que estudió, siendo el más frecuente en un 44,4% --C-- y el menos frecuente A-C-- en un 1,3%. Trataba de encontrar una cepa que estuviese implicada en las infecciones por Candida que sufrían los enfermos de cáncer en tratamiento, pero no encontró ningún biotipos que pudiera estar asociado a estos pacientes.

McCreigh utilizó el resistotipado para estudiar los biotipos de levaduras existentes en la boca y piel de pacientes con cáncer oral o laríngeo. Encontraron en todos los casos levaduras en la boca antes del tratamiento, pero no en piel. Después de comenzado el tratamiento, 25 de 27 enfermos portaban uno o más biotipos que eran idénticos en ambos sitios. La boca parecía pues la fuente para la colonización de la piel en las zonas de irradiación.

Hunter (112) estudió 90 C. albicans procedentes de vaginitis y 109 procedentes de heces de personas sanas que vivían en el mismo área geográfica, utilizando el método de McCreigh y no encontró ningún biotipo particular asociado a la producción de vaginitis. Porier (223) usando nuestra misma técnica, tipificó C. albicans en casos de vulvovaginitis crónica, encontrando siempre los mismos biotipos en distintas zonas genitales del mismo paciente y además que en un 73,3% portaban el mismo biotipo de C. albicans tanto en vagina como en el tracto gastrointestinal. Odds utilizó este método de resistotipado para buscar biotipos asociados con virulencia entre pacientes con trasplantes de médula o que tenían enfermedades hematológicas. El resultado fue que no encontró ningún tipo de asociación entre los biotipos de levaduras encontradas y el lugar de la colonización, el tratamiento antifúngico recibido, el tiempo de estancia en el hospital o la especie implicada.

En este sentido, en nuestro estudio se observó que los resistotipos de C. albicans, OCFBKKO, OCFBKKO, OCOBKKL y OOOBKOO, estaban asociados a muestras orales, y el resistotipo OOOOKOO sólo se localizó en cepas invasivas. En C. tropicalis un 35% de las cepas invasivas tenían resistotipo OCOBOOO, que al mismo tiempo resultó ser el más frecuente en esta especie. En cambio en C. parapsilosis el 50% de las cepas invasivas tuvieron resistotipo OOOOKKL dato que pudiera ser significativo. En C. glabrata un 60% de las cepas invasivas eran OOOBKOO, resistotipo que no se encontró entre los aislamientos procedentes de piel o de tracto gastrointestinal. El 66,6% de las cepas de T. beigeli con resistotipo OOOOOOO eran cepas invasivas, dato que también resultó significativo.

El método de resistotipado original fue realizado de forma manual, inoculando cada cepa de una en una sobre cada una de las placas conteniendo cada uno de los compuestos a ensayar. Nosotros mejoramos la técnica utilizando para dicha inoculación un replicador de Steer's automático. Al igual que nosotros Childress (46) empleó el método del resistotipado de Odds (193) pero utilizando un Clonemáster para la inoculación de las placas con lo que las variaciones entre replicados disminuía sensiblemente.

Frank Odds en un estudio en colaboración con 5 hospitales de diferentes nacionalidades (202) llega a la conclusión que los métodos de resistotipado tienen una buena reproducibilidad intralaboratorio pero esta se ve muy reducida cuando se comparan los resultados con los obtenidos en otros laboratorios.

6. MORFOTIPADO

Hunter (114) utilizó el método de Phongpaichit (221) para estudiar sus cepas de C. albicans, pero limitando el número de características a considerar. De este modo obtuvo 50 morfotipos diferentes, de los cuales OOOO fue el morfotipo mayoritario en el 23% de los casos, seguido de 7540 en el 16% y de 7340 en el 7%. Los datos obtenidos en este estudio discreparon de los obtenidos por Hunter en cuanto al morfotipo mayoritario y sus frecuencias. En el área de Madrid, donde se recogieron las cepas de este estudio, el morfotipo mayoritario resultó ser 7540 (BAF), con una frecuencia relativa del 36,4%, seguido de 7340 (BEF), mientras que el morfotipo OOOO(SB), que en el Reino Unido, donde Hunter (114) realizó su estudio era el morfotipo mayoritario, resultó en tercer lugar con una frecuencia del 6,9%. Por otro lado, Hunter encontró que el 67% de las cepas de infecciones muy graves mostraban morfotipos con borde discontinuo BD, frente al 11% en las infecciones menos graves. Los morfotipos con borde discontinuo podrían ser debidos a que una parte de la población creciera en forma levaduriforme y otra parte de la población en fase micelial. Si la virulencia depende

del estado de las células levaduriformes y de los diferentes estadios de la infección, entonces una cepa cuyo morfotipo fuera intermedio entre las dos formas posibles podría llegar a ser más virulenta que aquellas cepas que solo contuvieran una sola fase celular. En nuestro caso dichos morfotipos BD representaron el 36% de las cepas invasivas frente al 22% en las demás cepas, lo cual corroboraría dicha teoría. Sin embargo, en el caso de C. tropicalis, patógeno con demostrada patogenicidad, el 85% de las cepas virulentas resultaron morfotipo BAF, que era el mayoritario para esta cepa.

Comparando nuestros datos con los de otras áreas de España, se observaron algunas diferencias en las frecuencias de los morfotipos: en el País Vasco, los morfotipos mayoritarios fueron SB, seguido de BAF, y de BEF, sin embargo en la comunidad catalana, el morfotipo dominante fue BAF, coincidiendo con nuestros datos, seguido de los morfotipos SB.

Hay autores que han buscado algún tipo de indicador de virulencia en C. albicans empleando el morfotipado. Muchos de ellos aunque lo intentaron no encontraron dicha relación (195,201,112). Brow-Thomsen's utilizando este mismo método asoció virulencia con el morfotipo OOOO, sin embargo Hunter (112) no encontró dicho morfotipo abundante entre sus muestras de sangre, LCR o biopsias. Nosotros tampoco hemos encontrado ningún indicio de virulencia en este morfotipo, que representó el 7,3% entre nuestras cepas invasivas. Lo que si es posible es que alguna característica de la superficie de las levaduras pueda influir en su virulencia. Ghannoum (85) estudió la capacidad de adherencia de C. albicans como factor de virulencia, que es debida a moléculas que existen en la superficie de las células. El efecto de estas moléculas sobre el morfotipo no se conocen todavía. En este estudio, los morfotipos OOOO(SB) resultaron minoritarios entre las cepas invasivas de C. albicans. Además, entre otras especies de levaduras, de menos patogenicidad, los morfotipos OOOO fueron los mayoritarios y en muchos casos el único.

7. METODO DE MORFOTIPADO EN AGAR DE TRIFENILTETRAZOLIO

Es un nuevo método de tipado desarrollado en colaboración con el departamento de Microbiología e inmunología de la Universidad del País Vasco.

Quindós y cols. (236), utilizando este método, encontraron 16 morfotipos entre las cepas de C. albicans que estudiaban. El morfotipo dominante LR1N mostró una frecuencia del 88,3%, le siguió LR1S en un 17,3% de los casos, LR2S en el 15,2% y LR2N en el 14,7%. En dicho estudio compararon los morfotipos encontrados en diferentes áreas geográficas españolas, entre ellas 109 cepas de C. albicans de nuestra colección donde

encontraron como morfotipo mayoritario LR1n en el 55,9% de los casos, LV1N en el 25,7% y RR1N en el 11%. Teniendo en cuenta las diferencias en el criterio para establecer los códigos de dicho método, nuestro estudio coincidió con los encontrados por estos autores utilizando nuestras cepas, LRNN (46,3%), LVSN (18,1%) y LVSS (6,9%). El morfotipo mayoritario, LRNN, fue el dominante en todas las áreas geográficas estudiadas, sin embargo nuestro segundo biotipos en frecuencia LVSN resultó minoritario entre las cepas aisladas en Barcelona o Bilbao e incluso no se encontró entre las cepas del área de Londres y lo mismo ocurrió con el morfotipo RRNN. Por otro lado morfotipos muy frecuentes en el País Vasco y en Barcelona como LP1Y o LRSS fueron muy poco frecuentes en Madrid. Los datos de estos autores indicaron que el morfotipos LP2N era bastante frecuente en otras áreas de España y Londres, sin embargo no lo encontraron entre las cepas nuestras que analizaron. En conjunto, las cepas de C. albicans estudiadas en esta Tesis, mostraron una frecuencia comparable al resto de las zonas geográficas. No hemos podido encontrar ninguna relación entre un morfotipo particular y un área anatómica determinada.

Entre los aislamientos de C. tropicalis estudiados por Quindós y colaboradores (236) el morfotipo mayoritario fue LV2S con una frecuencia del 45%, que coincidió con nuestro morfotipo mayoritario, aunque en nuestro caso la frecuencia fue mucho menor. Sin embargo, nuestro segundo morfotipo en frecuencia, RVBNN, no fue observado por estos autores entre sus aislamientos de C. tropicalis. En esta especie encontramos cierta asociación entre los morfotipos LRSN, RVBNN y RVSN con invasividad ya que el 75%, 50% y 50% respectivamente de las cepas con dichos morfotipos resultaron virulentas.

Entre los aislamientos de C. parapsilosis el morfotipo mayoritario entre las cepas del País Vasco (236) fue LV2S que resultó el quinto en frecuencia entre nuestros aislamientos,; LVSN, RVSN, LRNN y RRNN resultaron morfotipos abundantes en ambas áreas, mientras que el morfotipo RVNN que fue el segundo en frecuencia entre nuestros aislamientos, sólo se encontró en una cepa del área de Bilbao.

Entre los aislamientos de C. glabrata estudiados por Quindós (236) no se encontró ningún morfotipo característico, ya que todas las cepas fueron incapaces de crecer en dicho medio. En nuestro estudio un 72,2% de las cepas de C. glabrata mostraron idéntico comportamiento, no siendo capaces de crecer en agar con trifeniltetrazolio, sin embargo encontramos 2 cepas con morfotipo RBNN ambas procedentes de muestras genitales y otras 3 con morfotipo RRNN.

En T. beigelij, el morfotipo RRNS pareció estar asociado a virulencia ya que el 80% de los aislamientos con dicho morfotipo resultaron ser cepas invasivas o aisladas de orina.

8. TIPADO MEDIANTE EL PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA

O'day y colaboradores (192), estudiaron un brote de endoftalmitis por C. parapsilosis utilizando como método de tipado el perfil enzimático y la susceptibilidad a antifúngicos. Utilizaron un método de microdilución en caldo y todas las cepas del brote mostraron el mismo perfil de sensibilidad. Compararon los datos obtenidos con 17 aislamientos de C. parapsilosis conservados en cepario que dieron diversos perfiles, lo cual parecía demostrar que el brote en cuestión había sido producido por una misma cepa.

Korting (129) utilizó también la idea del perfil de sensibilidad a antifúngicos para comparar las cepas de C. albicans aisladas de enfermos infectados con VIH en distintos estadios de la enfermedad. Encontró cepas que se volvían más resistentes a los imidazoles conforme avanzaba la enfermedad, mientras que no observó ningún tipo de variación en los polienos.

Alena Tomsikova utilizó un sistema de antifungigrama para tipar sus cepas de C. albicans con fines epidemiológicos. Encontró 9 perfiles diferentes siendo el más frecuente de ellos resistente a antifúngicos polienicos y sensible a imidazoles.

Utilizando el perfil de sensibilidad antifúngica se encontraron un 39% de cepas de C. albicans con perfil F5 asociadas a virulencia ya que correspondieron a cepas invasivas. En C. tropicalis los perfiles F12, F29 y F37 sólo se encontraron entre cepas invasivas, y lo mismo ocurrió con el perfil F3 en T. beigelii, representando el 40% de dichas cepas.

9. VARIACIONES FENOTIPICAS EN LEVADURAS

El fenómeno de las variaciones de liso a rugoso en C. albicans ya fue observado por P. Negroni en 1935 (189). David Soll (278-280) estudiando casos de candidiasis vulvovaginales a lo largo de un cierto período de tiempo llegó a la conclusión de que una misma cepa de C. albicans era capaz de cambiar de fenotipo y con ello producirse cambios en su patrón de sensibilidad a agentes antifúngicos.

Frank Odds (203) observó variaciones en las morfologías coloniales de aislamientos de C. albicans, C. parapsilosis y C. krusei, mientras que no lo observó entre los aislamientos de C. glabrata que estudió. Esto le sugirió que dichas variaciones fueran una propiedad bastante común entre muchos de los aislamientos de especies de Candida. Dicha capacidad

parecía influenciada por diversos factores externos. Por tanto, para mantener una buena reproducibilidad se necesitaba tener un control estricto sobre la composición del medio, el grosor del agar en las placas, las condiciones de humedad y temperatura en la incubación y realizar los aislamientos siempre a partir de un única colonia. En este estudio Odds encontró variaciones en C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis y C. krusei, pero no los observó en ninguna de las cepas de C. glabrata que estudió. En el presente estudio se observaron algunos de estos fenómenos, como las variaciones de C. albicans de colonia cremosa blanca a opaca y de lisas a rugosas, en C. tropicalis donde se observaron variaciones blanca-opaca o las variaciones en C. parapsilosis de lisa a rugosa. En T. beigeli se encontraron variantes opacas y completamente vellosas, algunas de estas últimas asociadas con cepas virulentas.

10. TEORIA DEL POLIMORFISMO ADAPTATIVO

La teoría del polimorfismo adaptativo predice que las especies que ocupan amplios nichos ecológicos serán fenotípicamente y genotípicamente más variables que las que ocupan nichos estrechos (116). Mirando la ecología de las levaduras parece que C. albicans y C. glabrata son comensales animales obligatorios, mientras que C. tropicalis y C. parapsilosis parecen comensales facultativos y otras levaduras como C. neoformans parecen ser microorganismos ambientales con preferencia por los detritus de las aves. Respecto a esta teoría, Hunter (116) en 1990 realizó un estudio de biotipado entre distintas levaduras y sus resultados confirmaron un aumento de la varianza de la población desde los comensales obligados (menos biotipos) hacia los facultativos, y los microorganismos ambientales (más biotipos) como predice la teoría del polimorfismo adaptativo. A este respecto parece que la presión selectiva tiene más efecto sobre el polimorfismo que la mutación.

Esto viene a decir que en C. albicans y C. glabrata tendríamos que encontrar menos proporción de biotipos que en C. tropicalis y C. parapsilosis, y éstos menos que en T. beigeli o C. neoformans. En los datos observados en este estudio, esta relación se cumple en la dirección de C. albicans o C. glabrata, C. tropicalis y T. beigeli o C. neoformans. En estos casos, casi en todos los métodos de tipado analizados se observaron menos proporción de biotipos en relación al número de cepas estudiadas en C. albicans que en C. tropicalis o que en T. beigeli sucesivamente. Sin embargo no observamos que esta teoría del polimorfismo se cumpliera en el caso de C. parapsilosis, puesto que debería, según dicha teoría, tener más tipos posibles que C. albicans no siendo así en ninguno de los métodos ensayados.

11. ANALISIS DE LOS BIOTIPOS DE 107 AISLAMIENTOS ORALES DE VIH SEROPOSITIVOS Y NO VIH.

La candidosis oral es la forma más frecuente de infección en los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia adquirida. En este estudio se trató de buscar mediante los métodos de biotipado si había algún biotipo de levaduras asociado a infecciones en estos pacientes.

Korting y colaboradores (129), en un estudio similar, analizaron 62 aislamientos de C. albicans que tiparon empleando el sistema API 20C, encontraron que el biotipo B (2576174) se repetía en el 63,9% de las cepas estudiadas. El resto de las cepas se repartió en otros 8 biotipos minoritarios. Observaron que las resistencias a flucitosina aumentaban conforme progresaba la infección por VIH, sin que dichos enfermos hubieran estado tratados anteriormente con dicho fármaco. No observaron variación en la sensibilidad de C. albicans en los distintos estadios de la enfermedad. Con anfotericina B, la mayoría de las cepas mostraron una sensibilidad intermedia.

En nuestro estudio se observó un claro predominio de C. albicans (74,5%) entre los aislamientos de levaduras de la población VIH frente a la población normal, donde esta especie representó el 42,3%. También se observó un predominio del biotipo 2576174, como ya observó Korting, entre la población VIH (58,2%) respecto a la población normal (30%). Empleando la técnica del resistotipado se observó un resistotipo dominante en la población VIH: OCOOOOO (21,8%) respecto a la población normal (9%), con un dominio de los biotipos resistentes a citrato en la población VIH (76,4%), respecto del control (53%). Con la Técnica del morfotipado se observó una dominancia de los morfotipos sin borde (20%) frente a la población normal (9%). Con el método AST se encontró un claro predominio del morfotipo LRNN en la población VIH (47,3%) respecto a la población control (13,4%), y un predominio de los biotipos con halo de hifas (48%) en la población control respecto a la población VIH (12%). El perfil enzimático mostró el perfil E16 entre la población VIH (12%) que no se encontró en la población control.

No se encontró ninguna variación significativa en los patrones de sensibilidad a los antifúngicos entre una población y otra. Korting encontró sensibilidad intermedia a la anfotericina B, sin embargo en nuestro estudio todos los aislamientos fueron homogéneamente sensibles a dicho antifúngico. En cambio, nosotros observamos una sensibilidad intermedia de la mayoría de los aislamientos al ketoconazol.

12. COMPARACION ENTRE LOS METODOS DE TIPADO ESTUDIADOS

12.1 OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS UTILIZADAS

Cuando se estudia el valor de un método de tipado, hay tres características fundamentales que se deben tener en cuenta: la tipabilidad, la reproducibilidad y el poder de discriminación. Otros valores que también deberían considerarse son el coste, la sencillez de utilización y la rapidez de la técnica.

La tipabilidad de un método es la proporción de una población de aislamientos que puede ser tipado con un determinado método. Todos los métodos de tipado de C. albicans tienen un 100% de tipabilidad (109). Todos nuestros métodos dieron una tipabilidad del 100% con la excepción del método AST donde un 72,2% de las cepas de C. glabrata resultaron no tipables. Quindós y colaboradores (236) utilizando dicho método encontraron 11 cepas de C. albicans que no resultaron tipables y tampoco lo fueron las cepas de C. glabrata que ensayaron. Este método por tanto no fue capaz de discriminar bien los diferentes morfotipos de C. glabrata ya que estas cepas no eran capaces de crecer en agar de trifeniltetrazolio.

La reproducibilidad de nuestros aislamientos como expresión de la estabilidad de los códigos asignados a cada cepa, para el método API osciló en un rango entre el 75 y el 97% dependiendo de las especies ensayadas, y fue del 87% para C. albicans. Las principales razones por las que variaban los biotipos fueron la utilización de cultivos viejos de más de 48H y no ajustar bien el inóculo. Hellyar (99) indicó una reproducibilidad de API para sus C. albicans del 78%, mientras que Williamson (307) obtuvo un 96,6%. La reproducibilidad del sistema API ZYM en el presente estudio osciló entre el 70 y el 100% dependiendo de las cepas estudiadas, siendo del 84% para C. albicans. En el estudio realizado por Williamson (307), encontraron una reproducibilidad del 96,6% y para Casal fue del 100%. La reproducibilidad de nuestro método de resistotipado osciló en rangos entre el 70 y el 87%. McCreight (169) encontró un 96% de reproducibilidad in vitro para las pruebas de resistotipado. Sin embargo Hunter y Fraser (112) usando una modificación de dicho sistema encontraron rangos de reproducibilidad entre el 77 y el 100% dependiendo del número de pruebas requeridas para diferenciar entre cepas. La reproducibilidad del resistotipado según Odds (202) daba buenos resultados intralaboratorio, sin embargo la concordancia interlaboratorio era muy baja. Odds (193) encontró una reproducibilidad para su método de resistotipado del 95%. En nuestro estudio no encontramos unos porcentajes tan buenos, ya que nuestros valores de reproducibilidad oscilaron entre el 70% en C. albicans y el 87% en C. tropicalis. Childress y colaboradores (46) utilizando el método de Odds, pero inoculando con replicador igual que nosotros, encontraron una reproducibilidad por encima del 95%.

La reproducibilidad del morfotipado osciló entre el 50 y el 80% para el morfotipado I y el 92 y el 100% en el caso del morfotipado II. Entre los factores que se observó que afectaban a los morfotipos destaca el sobrecalentamiento del medio de extracto de malta que hacía desaparecer la producción de hifas en el margen de las colonias y la profundidad del agar en las placas de petri que también alteraba la morfología. Phongpaichit y cols. (221) encontraron una reproducibilidad para el morfotipado I del 84% en C. albicans, mientras que Hunter y Fraser (114) utilizando el morfotipado II obtuvieron una reproducibilidad del 89%. El problema del morfotipado I (114) era que la gran diversidad de morfotipos posible hacía difícil comparar una población. Con el morfotipado I reducían los morfotipos posibles a seis aumentando la reproducibilidad, pero al disminuir la diversidad también lo hace la discriminación entre cepas. La reproducibilidad del método AST mostró un rango que osciló entre el 75 y el 93% dependiendo de las especies consideradas, siendo del 83% para C. albicans. Quindós y cols. (236) encontraron rangos entre el 85 y el 100%, siendo del 95% para C. albicans. Observan al igual que nosotros que el sobrecalentamiento del medio durante su preparación y variaciones en la temperatura de incubación producía diferencias en los morfotipos. Utilizando el perfil de sensibilidad antifúngica la reproducibilidad osciló entre rangos del 75 al 87%, siendo del 87% para C. albicans. Encontramos variaciones en los perfiles de sensibilidad a los antifúngicos cuando no se ajustaban bien los inóculos y cuando se producían variaciones en la profundidad del agar en las placas.

En C. albicans hubo un rango entre el 50 y el 94% en los valores de reproducibilidad entre los diferentes métodos estudiados. El mejor valor de reproducibilidad se consiguió con el morfotipado I. En C. tropicalis los rangos fluctuaron entre el 60 y el 97% obteniéndose el valor más alto tanto para el API como para el perfil enzimático y el morfotipado II. En C. parapsilosis osciló entre el 70 y el 100% que se obtuvo también con el morfotipado II. En cambio, en T. beigelii los valores de reproducibilidad oscilaron entre el 58 y el 93% que correspondió al perfil de sensibilidad a antifúngicos. En C. glabrata el mejor valor se obtuvo con el perfil enzimático que fue del 100%.

La discriminación de un método es una estima de su habilidad para diferenciar dos cepas no relacionadas. De acuerdo con el índice de diversidad de Simpson, en el caso de C. albicans se obtuvieron rangos de discriminación entre el 0,4 en el método API 20C y el 0,89 en el caso del resistotipado y del perfil de sensibilidad antifúngica. Esto significaba que si dos cepas de C. albicans son elegidas al azar, tendrían una probabilidad del 89 %, en el método de sensibilidad a antifúngicos, de caer dentro de dos morfotipos diferentes. Otros autores encontraron valores de discriminación mejores y peores que los nuestros. Hunter (114) encontró una $D = 0,9$ para su método de morfotipado I, con las cepas de C. albicans que utilizó. Sin embargo cuando empleó el morfotipado II la discriminación bajó a 0,615. El resistotipado según McCreight y Warnock (167) mostró una $D = 0,882$. En cambio según

Hunter y Fraser (115), usando un resistotipado modificado el índice de discriminación resultó de 0,564. Utilizando el API 20C, Syverson (284) consiguió una $D=0,431$, prácticamente idéntico al valor obtenido en este estudio. Casal y Linares (39) utilizando la variabilidad de cuatro enzimas del API ZYM encontraron una $D=0,549$. Otros autores, empleando este método encontraron valores de discriminación aún más bajos, $D=0,487$, $D=0,471$ (307,308), o incluso $D=0,308$ (116). En nuestro estudio utilizando la información de todas las enzimas del API ZYM se consiguió una $D=0,81$. En C. tropicalis los valores de discriminación más bajos se encontraron en el morfotipado II (0,51), obteniéndose los valores más altos con el perfil de sensibilidad antifúngica (0,97). El morfotipado II no fue capaz de discriminar entre los aislamientos de C. parapsilosis estudiados, los mejores valores de discriminación para esta especie se encontraron con los métodos de resistotipado y de morfotipado en agar de trifeniltetrazolio que fueron del 0,86 y del 0,85 respectivamente. Quindós y cols. (236) encontraron distintos valores de discriminación para su método AST según las especies consideradas. Así, dicho valor osciló entre 0,811 para C. tropicalis, 0,769 para C. parapsilosis y C. guilliermondii, 0,757 para C. albicans, 0,416 para C. krusei o de 0 para C. glabrata.

Analizando estos parámetros en conjunto, observamos que en C. albicans los métodos que mostraron mejor combinación de reproducibilidad y discriminación fueron el perfil de sensibilidad a los antifúngicos, seguido del morfotipado II y del perfil enzimático. En C. tropicalis el método que mostró mejor combinación fue el perfil enzimático seguido del perfil de sensibilidad a los antifúngicos y del morfotipado AST. En el caso de C. parapsilosis, ninguno de los métodos mostró resultados excelentes, siendo el resistotipado y el morfotipado AST los que dieron mejores resultados. En T. beigelii la mejor combinación entre reproducibilidad y discriminación se obtuvo con el resistotipado, seguido del perfil de sensibilidad a los antifúngicos. En el caso de C. glabrata la mejor combinación se obtuvo con el resistotipado y el perfil de sensibilidad a los antifúngicos.

12.2 DISTANCIA ENTRE BIOTIPOS

Utilizando las distancias taxonómicas entre biotipos dentro de cada una de las especies, pudimos observar que algunos métodos establecían distancias taxonómicas mayores que otros. Así pues, los métodos API 20C y el morfotipado AST, en la mayoría de los casos agrupaban casi todos los biotipos a distancias taxonómicas cortas, lo que indicaba que según estos métodos, todos los aislamientos de dichas especies mantenían una gran homogeneidad, estarían muy próximas taxonómicamente y su capacidad para diferenciar entre biotipos sería

baja.

Otros métodos, como el API ZYM, el resistotipado y el perfil PSA, permitían establecer un número considerable de grupos a distancias taxonómicas intermedias, lo que indicaba que eran buenos marcadores de la diversidad dentro de una especie y, por tanto, su capacidad para diferenciar entre biotipos era alta.

12.3 CORRELACION ENTRE METODOS

En C. albicans la mejor correspondencia entre métodos (correlación), se dio entre el método API 20C y el morfotipado, sin embargo el método API 20C mostró una discriminación muy baja. En C. tropicalis se encontró muy buena correlación entre el morfotipado y el API 20C, el perfil enzimático API ZYM, el perfil de sensibilidad a los antifúngicos y el morfotipado en agar de Sabouraud-trifeniltetrazolio, que por otro lado, mostraron bastante buena discriminación y reproducibilidad. En C. parapsilosis se obtuvo una completa correlación entre el morfotipado y el resto de los métodos comparados. En T. beigeli se encontró también correlación entre el morfotipado y el API 20C, el perfil enzimático, el resistotipado y el perfil de sensibilidad a los antifúngicos. En C. glabrata hubo correspondencia entre el API 20C, el perfil enzimático, el perfil de sensibilidad a los antifúngicos y el morfotipado en agar de Sabouraud-trifeniltetrazolio, encontrándose complementariedad (métodos independientes) entre el morfotipado y el resto de los métodos comparados.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- En nuestro hospital, al igual que en otras series, la especie aislada con más frecuencia fue C. albicans, seguida a distancia del resto de las especies. Destacó la elevada frecuencia de aislamientos de T. beigelii, que ocupó el cuarto lugar en nuestro trabajo.
- 2.- En cuanto a su procedencia, cabe destacar que C. lusitaniae, C. kefyr y T. beigelii se asociaron a infecciones en tejidos profundos.
- 3.- La anfotericina B continua siendo un antifúngico muy eficaz, sin embargo se encontraron porcentajes elevados de resistencia en el caso de C. lusitaniae y T. beigelii.
- 4.- Los imidazoles en su conjunto se mostraron muy activos frente a nuestros aislamientos. Cabe destacar la resistencia de C. lusitaniae al ketoconazol, y el caso del fluconazol, donde la resistencia que presentaron la mayoría de las cepas en nuestro estudio "in vitro", no se correspondía con su eficacia observada "in vivo".
- 5.- El extracto de Allium sativum demostró ser muy activo frente a todos los aislamientos de levaduras, marcando una posible línea de investigación.
- 6.- De los 6 métodos de tipado estudiados los que mostraron mejor combinación de reproducibilidad y discriminación en C. albicans fueron el PSA, el morfotipado y el perfil enzimático; en C. tropicalis el perfil enzimático y el AST, y en el resto de las especies lo fueron el resistotipado y el PSA.
- 7.- C. albicans y C. tropicalis compartieron el mismo perfil enzimático mayoritario (E10), lo cual corroboraba su proximidad taxonómica. El perfil E16 sólo se encontró entre los aislamientos orales de la población VIH y no en la población control.
- 8.- Con el resistotipado se observó que la mayoría de los aislamientos de C. albicans eran resistentes a citrato, lo que indicaría su capacidad para crecer a pH bajo.
- 9.- El morfotipo mayoritario en C. albicans fue BAF, sin embargo la mayoría de las cepas invasivas presentaron morfotipo BD; esto sugeriría una asociación del morfotipo BD a virulencia.
- 10.- Con el PSA un número relevante de aislamientos de C. albicans con perfil F5 se asoció también a virulencia.
- 11.- Algunos morfotipos AST aparecieron con una frecuencia mucho mayor que la observada en otras áreas de España y del Reino Unido.

12.- El morfotipado fue el método que se correlacionó mejor con el resto de los métodos estudiados.

13.- El perfil enzimático, el resistotipado y el PSA, permitieron establecer un número considerable de grupos situados a distancias taxonómicas intermedias, lo que indicaba que eran buenos marcadores de la diversidad dentro de una especie y, por tanto, su capacidad para diferenciar entre biotipos era alta.

14.- Hay que continuar investigando sistemas de biotipado, ya que los métodos estudiados no se asociaron de forma suficiente con la capacidad patógena de las levaduras de interés clínico.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akova M, Akalin HE, Uzun O, Gur D. Emergence of Candida krusei infection after therapy of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10: 598-599.
- 2.- Anaissie E, Paetznick V, Bodey GP. Fluconazole susceptibility testing of Candida albicans: microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1641-1646.
- 3.- Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a Cancer Center and review. Clin Infect Dis 1992; 14: S43-53.
- 4.- Badenhorst L. The incidence of hospital fungal infections yeast fungaemia. S Afr Med J 1991; 79: 302-303.
- 5.- Baker JG, Salkin IF, Pincus DH, D'amato RF. Use of rapid auxanographic procedures for recognition of an atypical Candida. J Clin Microbiol 1981; 13: 652-654.
- 6.- Baker JG, Salkin IF, Pincus DH, D'amato RF. Diagnostic characters of an atypical Candida. J Clin Microbiol 1981; 13: 199-203.
- 7.- Banerjee SN. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the US 1980-1989. Am J Med 1991; 16: 865-895.
- 8.- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 1983. Cambridge University Press, Cambridge.
- 9.- Beggs WH. Rapid fungicidal action of tioconazole and miconazole. Mycopathologia 1987; 97: 187-188.
- 10.- Bergendal T, Holmberg K, Nord CE. Yeast colonization in the oral cavity and feces in patients with denture stomatitis. Acta Odontol Scand 1979; 37: 37-45.
- 11.- Bergman AG, Kaufman A. Dermatitis due to Sporobolomyces. Arch Dermatol 1984; 120: 1059-1060.
- 12.- Bille J, Stockman L, Roberts GD. Detection of yeasts and filamentous fungi in blood cultures during a 10-years period (1972 to 1982). J Clin Microbiol 1982; 16: 968-970.
- 13.- Bingham JS. Vulvo-vaginal candidosis-an overview. Acta derm Venereol 1986; suppl

12: 39-46.

13a.- Bisquerra Alzina R. Introducción conceptual al análisis multivariante. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, USREL y SPAD. Voll II. 1989, PPU Barcelona.

14.- Blinkhorn RJ, Adelstein D, Apagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen, Candida lusitanae. J Clin Microbiol 1989; 27: 236-240.

15.- Bobey DG, Ederer GM. Rapid detection of yeast enzymes by using 4-methylumbelliferyl substrates. J Clin Microbiol 1981; 13: 393-394.

16.- Bodey GP. Azole antifungal agents. Clin Infect Dis 1992; 14: S161-169.

17.- Bosch J, Esque M, Carbonell X. Infecciones graves por Candida parapsilosis en el lactante. An Esp Pediatr 1990; 32: 70-72.

18.- Brass C. Antimycotic therapy: a critical appraisal. Antimicrob News 1984; 1: 35-39.

19.- Brawner DL, Cutler JE. Oral Candida albicans isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1989; 27: 1335.

20.- Brown-Tomsen J. Variability in Candida albicans. Studies on morphology and biochemical activity. Hereditas 1968; 60: 355-398.

21.- Bruatto M, Vidotto V, Marinuzzi G, Raiteri R, Sinicco A. Candida albicans biotypes in human immunodeficiency virus Type 1-infected patients with oral candidiasis before and after antifungal therapy. J Clin Microbiol 1991; 29: 726-730.

22.- Bruggemann L, Flemming I, Nagel B. Feature selection approach for diagnosis in microbiology and its application to yeast species. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 7-11.

23.- Bueno J, López A, Estibalez A, Juliá A, Mássagué I, Auau J, Acebedo G. Infecciones por hongos en pacientes granulopénicos. Sangre 1988; 33: 341-346.

24.- Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. J Clin Microbiol 1979; 9: 565-569.

- 25.- Burnie J. A reverse passive latex agglutination test for the diagnosis of systemic candidosis. *J Immunol Methods* 1985; 82: 267-280.
- 26.- Burnie J, Matthews RC. Immunoblot analysis: a new method for fingerprinting hospital pathogens. *J Immunol Methods* 1987; 100: 41-46.
- 27.- Cabronero MC, Campos E, Picazo JJ. Slide latex agglutination test for detection of vaginal candidosis. *Rev Iber Micol* 1988; 5: 109.
- 28.- Cabronero MC, Rodríguez. Avial C, Campos E, Gómez-Lus ML, Picazo JJ. Sensibilidad de aislamientos clínicos de Candida a diversos antifúngicos. XI Congreso Nacional de Microbiología. Ed. Carlos Hardisson Rumeau 1987; 1: 603.
- 29.- Cabronero C, Campos E, Betriú C, Picazo JJ. Study of the enzymatic profiles as a clinical-epidemiological marker in yeast. *Recent Advances in Chemotherapy* 1989; 2: 531.1-2. Ed Ethan Rubinstein and Dieter Adam. E Lewin-Epstein Ltd. Offset Printers.
- 30.- Cabronero MC, Campos E, Rodríguez-Avial C, Gómez-Lus ML, Picazo JJ. Sensibilidad a nuevos antifúngicos de especies de Candida aisladas en el Hospital Universitario San Carlos. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 4: 349-352.
- 31.- Cabronero C, Campos E, Betriú C, Cabronero MJ, Picazo JJ. Efecto del medio de cultivo en la sensibilidad de las levaduras a los antifungicos. I Congreso Ibérico de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 1989: 34A.
- 32.- Cabronero C, Campos E, Rodríguez-Avial C, Cabronero MJ, Picazo JJ. Efecto inhibitorio y letal de anfotericina B y ketoconazol frente a levaduras. I Congreso Ibérico de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 1989: 34B.
- 33.- Cabronero MC, Campos E, Picazo JJ, Romero J. Evaluación de un método de aglutinación de partículas de latex sensibilizadas para la detección de candidiasis vaginal. *Med Clin* 1990; 94: 329-332.
- 34.- Cabronero MC. 1990. Antifúngicos, 3: 149-168. En: Cisterna Cáncer R (Ed.). Plan de formación en enfermedades infecciosas. Módulo 3. Antimicrobianos. Madrid.
- 35.- Cabronero C, Rodríguez-Avial C, Picazo JJ. Phenotypic analysis of 106 yeast strains isolates from the oral cavities of AIDS and non-AIDS patients. VIII Congreso Mediterraneo de Quimioterapia 1992. Grecia.

- 36.- Cabronero C, Rodríguez-Avial C, Gómez M, Picazo JJ. Phenotypic characterization of Candida albicans isolates. J Chemother. En prensa.
- 37.- Caprilli F, Prignano G, Latella C, Tavarozzi S. Amplification of the killer system for differentiation of candida albicans strains. Mykosen 1985; 569: 28.
- 38.- Carruba G, Pontieri E, Bernardis F, Martino Pietro, Cassone A. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of Candida parapsilosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 916-922.
- 39.- Casal M, Linares MJ. Preliminary investigation of Candida albicans biovars. J Clin Microbiol 1983; 18: 430-431.
- 40.- Casal M, Linares MJ. Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest. Mycopathologia 1983; 81: 155-159.
- 41.- Casal M, Linares MJ, Blanco MC. Proposición de un nuevo sistema de biovariedades enzimáticas (biotipos) de Candida albicans. Infectologika 1985; 6: 225-228.
- 42.- Casal M, Linares MJ, Blanco CM. Descripción de cuatro nuevas biovariedades de Candida albicans de interés clínico-epidemiológico. Enf Inf y Microbiol Clin 1987; 5: 205-208.
- 43.- Casals JB. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. J Clin Microbiol 1979; 32: 719-722.
- 44.- Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi, L. Evidence of a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. J Infect Dis 1987; 156: 777.
- 45.- Cheung LL, Hudson JB. Development of DNA probes for Candida albicans. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 10: 171-179.
- 46.- Childress CM, Holder IA, Neely AN. Modifications of Candida albicans biotyping system. J Clin Microbiol 1989; 27: 1392-1394.
- 47.- Clemons KV, Shankland GS, Richardson MD, Stevens DA. Epidemiologic study by DNA typing of a Candida albicans outbreak in heroin addicts. J Clin Microbiol 1991; 29: 205-207.

- 48.- Cook RA, McIntyre KA, Galgiani JN. Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1542-1545.
- 49.- Cooper BH, Land GA. Assimilation of protocatechuric acid and p-hydroxybenzoic acid as an aid to laboratory identification of Candida parapsilosis and other medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 343-345.
- 50.- Cooper BH. Clinical laboratory evaluation of a screening medium (CN screen) for Cryptococcus neoformans. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 672-674.
- 51.- Crislip MA, Edwards JE. Candidiasis. En: *Systemic fungal infections: diagnosis and treatment II. Infectious disease clinics of north America* 1989; 3: pp 103-106. WB Saunders company. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia.
- 52.- Daza RM, Martínez-Martínez L, Portero-Azorín F, Sánchez Sousa A, Dámáso D. Estudio comparativo del API 20C AUX y Abbott Quantum II yeast identification system en la identificación de especies de levaduras. *Rev Esp Microbiol Clin* 1986; 1: 311-317.
- 53.- Degregorio MW, Lee WMF, Linker Ca, Jacobs RA, Ries CA. Fungal infections in patients with acute leukaemia. *Am J Med* 1982; 73: 543.
- 55.- Di Silverio A, Brazzelli V, Brandozzi G, Barbarini G, Maccabruni A, Sacchi S. Prevalence of dermatophytes and yeasts (Candida spp., Malassezia furfur) in HIV patients. A study of former drug addicts. *Mycopathologia* 1991; 114: 103-107.
- 56.- Dittmar W, Jevic N. Microbiological penetration studies on ciclopirox and imidazole antimycotics using postmortem skin. En: *Proceedings of the 25Th International Congress of Dermatology* 1979; p: 730-732. Editado por: Gonzalez-Ochoa A, Domínguez-Soto I, Ortiz Y. Excerpta Médica. Amsterdam-Oxford-Princeton.
- 57.- Dixon D, Shadomy S, Shadomy HJ. Comparison of the in vitro antifungal activities of miconazole and a new imidazole, R41,400. *J Infec Dis* 1978; 138: 245-248.
- 58.- Doebbeling BN, Hollis RJ, Isenberg HD, Wenzel RP, Pfaller MA. Restriction fragment analysis of a Candida tropicalis outbreak of sternal wound infections. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1268-1270.
- 59.- Doern GV, Tubert TA, Chapin K, Rinaldi MG. Effect of medium composition on results

of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. J Clin Microbiol 1986; 24: 507-511.

60.- Dupont B, Drouhet E. Fluconazole in the management of oropharyngeal candidosis in a predominantly HIV antibody-positive group of patients. J Med Vet Mycol 1988; 26: 67-71.

61.- Dutton S, Penn CW. Biological attributes of colony-type variants of Candida albicans. J Gen Microbiol 1989; 135: 3363-3372.

62.- Eng RHK, Drehmel R, Smith SM, Goldstein EJC. Saccharomyces cerevisiae infection in man. J Med Vet Mycol 1984; 22: 403-407.

63.- Eng C, Valenstein P. Standardization of yeast inocula with an electronic impedance counter. J Clin Microbiol 1989; 27: 2397-2399.

64.- EPINCAT, Grupo de trabajo. Prevalencia de las infecciones nosocomiales en Cataluña. (II) Gérmenes y antimicrobianos. Med Clin 1990; 95: 161-168.

65.- Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between Candida albicans in saliva and the clinical status of human subjects. J Clin Microbiol 1980; 12: 475-476.

66.- Espinel-Ingroff A, Kerkering TM, Goldson PR, Shadomy S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol 1991; 29: 1089-1094.

67.- Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol 1992; 30: 3138-3145.

68.- Feldman WE, Hedaya E, O'Brien M. Skin abscess cause by Candida albicans: unusual presentation of C. albicans disease. J Clin Microbiol 1990; 12: 44-45.

69.- Falgueras L, Pahissa A, Almirante B, Martínez Vázquez JM, Arcalis L, Fernández F. Infección intrahospitalaria en un servicio de medicina interna. Med Clin 1987; 89: 366-369.

70.- Feldman WE, Hedaya E, O'Brien M. Skin abscess cause by Candida albicans: unusual presentation of C. albicans disease. J Clin Microbiol 1990; 12: 44-45.

- 71.- Fisher MA, Shen S, Haddad J, Tarry WF. Comparison of in vivo activity of fluconazole with that of amphotericin B against Candida tropicalis, Candida glabrata, and Candida krusei. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1443-1446.
- 72.- Fox BC, Mobley ML, Wade JC. The use of a DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts. J Infect Dis 1989; 159: 488-494.
- 73.- Fromtling RA, Yu HP, Shadomy S. In vitro antifungal activities of Bay N 7133 and Bay L 9139, two new orally absorbed antifungal imidazole derivatives, against pathogenic yeasts. Mycopathologia 1984; 86: 45-50.
- 74.- Fromtling RA. 1987. In vitro methods in the evaluation of antifungal agents. pp 7-14 En: Fromtling RA (Ed.). Recent Trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. JR Prous Science Publishers.
- 75.- Fung JC, Danta ST, Tilton RC. Candida detection system (CAND-TEC) to differentiate between Candida albicans colonization and disease. J Clin Microbiol 1986; 24: 542-547.
- 76.- Galgiani JN, Stevens DA. Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. Antimicrob Agents Chemother 1976; 10: 721-726.
- 77.- Galgiani JN, Stevens DA. Turbidimetric studies of growth inhibition of yeasts with three drugs: inquiry into inoculum-dependent susceptibility testing, time of onset of drug effect, and implications for current and newer methods. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 249-254.
- 78.- Galgiani JN. Why not standardize antifungal susceptibility testing?. Antimicrob News 1984; 1: 40.
- 79.- Galgiani JN. The need for improved standardization antifungal susceptibility testing. En: Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents 1987; pp 15-24. Ed RA Fromtling. JR Prous Science Publishers.
- 80.- Galgiani JN, Reiser J, Braus C, Espinel-Ingroff A, Gordon MA, Kerkering TM. Comparison of relative susceptibilities of Candida species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1343-1347.
- 81.- Galgiani JN. Susceptibility of Candida albicans and other yeasts to fluconazole: relations between in vitro and in vivo studies. Rev Iect Dis 1990; 12: S272-S275.

- 82.- Gallach C, Torres JM, Madrenys N. Una técnica de identificación rápida de levaduras: el método de seroaglutinación. *Med Clin* 1989; 93: 397.
- 83.- García de Lomás J, Morales C, Grau MA, Nogueira JM. Candidiasis diseminada. Estudio experimental I. Diagnóstico directo, detección de anticuerpos anti-candida y estudio histológico. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1988; 6: 82-88.
- 84.- Gatell Jm, Trilla A, Latorre X, Almela M, Mensa J, Moreno A, Miro JM, Martínez JA, Jimenez MI, Soriano E, García San Miguel J. Nosocomial bacteremia in a large Spanish Teaching Hospital: analysis of factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 203-210.
- 85.- Ghannoum MA, Motawy MS, AL-Mubarek AL, AL-Awwadhi HA. Candida albicans strain differentiation in cancer patients undergoing therapy. *Mykosen* 1985; 28: 388-393.
- 86.- Glee PM, Russell PJ, Welsch JA, Pratt JC, Cutler JE. Methods for DNA extraction from Candida albicans. *Anal Biochem* 1987; 164: 207-213.
- 87.- Glyn E, Evans V, Lacey CJN, Carney JA. Criteria for the diagnosis of vaginal candidosis: evaluation of a new latex agglutination test. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1986; 22: 365-371.
- 88.- Gonzalez López-Valcárcel, B. Análisis multivariante. Aplicación al ámbito sanitario. 1991. SG Editores SA, Barcelona.
- 89.- Gray LD, Roberts GD. Laboratory diagnosis of systemic fungal diseases. En: Systemic fungal infection: diagnosis and treatment I. Infectious disease clinics of north America 1988; 2: 779-804. DJ Drutz Guest Editor. WB Saunders Company.
- 90.- Gray LD, Roberts GD. Identification of medically important yeasts. *Clin Microb News* 1988; 10: 73-80.
- 91.- Graybill JR. Therapeutic agents. En: Systemic fungal infections: diagnosis and treatment I. Infectious disease clinics of north America 1988; 2: 805-826. DJ Drutz Guest Editor. WB Saunders Company.
- 92.- Guého E, Hoog GS, Smith MT, Meyer SA. DNA relatedness, taxonomy, and medical significance of Geotrichum capitatum. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1191-1194.

- 93.- Hanseclever HF, Mitchell WO. Antigenic studies of Candida. I. Observation ov two antigenic groups in Candida albicans. J Bacteriol 1961; 82: 570.
- 94.- Hanson LH, Stevens DA. Evaluation of cilofungin, a lipopeptide antifungal agent, in vitro against fungi isolated from clinical specimens. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1391-1392.
- 95- Hariri ALR, Hempel HO, Kimberlin CL, Goodman NL. Effect of time lapse between sputum collection and culturing on isolation of clinically significant fungi. J Clin Microbiol 1982 15: 425-428.
- 96.- Hasyn JJ, Buckley HR. Evaluation of the automicrobic system for identification of yeasts. J Clin Microbiol 1982; 16: 901-904.
- 97.- Heard GM, Fleet GH. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. J Appl Bacteriol 1990; 68: 447-451.
- 98.- Heeres J, Hendrickx R, Van Cutsem J. Antimycotic azoles 6. Synthesis and antifungal properties of terconazole a novel triazole ketal. J Med Chemistry 1983; 26: 611-613.
- 99.- Hellyar AG. The frequency distribution and consistency of assimilation biotypes of Candida albicans. J Hyg Camb 1986; 96: 89-93.
- 100.- Hernández-Molina JM, Losá J, Martínez-Brocal A, de la Rosa M. Sensibilidad de levaduras del género Candida a nuevos agentes antifúngicos. Enf Infec y Microbiol Clin 1991; 9: 405-408.
- 101.- Hoepfich PD, Finn PD. Ofuscation of the activity of antifungal antimicrobics by culture media. J Infect Dis 1972; 126: 353-361.
- 102.- Hoffman KKK, Weber DJ, Rutala WA. Pseudoepidemic of Rhodotorula rubra in patients undergoing fiberoptic bronchoscopy. Infect Control Hosp Epidemiol 1989; 11: 511-514.
- 103.- Holmstrup P, Axéll T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990; 48: 56-59.
- 104.- Hopwood V, Evans EGV, Carney JA. A comparison of methods for the detection of Candida antigens. Evaluation of a new latex reagent. J Immunol Methods 1985; 80: 199-210.

- 105.- Hopwood V, Evans EGV, Carney JA. Rapid diagnosis of vaginal candidosis by latex particle agglutination. *J Clin Pathol* 1985; 38: 455-458.
- 106.- Hopwood V, Warnock DW. Nuevos desarrollos en el diagnóstico de la infección por hongos oportunistas. *Rev Esp Microbiol Clin* 1987; 2: 285-294.
- 107.- Horn R, Wong B, Kiehn T, Armstrong D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset and results of therapy. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 646-655.
- 108.- Howard DH, Zeuthen ML, Dabrowa N. Phenotypic characteristics of a slow-growing, nongerminating variant of Candida albicans. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 2359-2366.
- 109.- Howell SA, Noble WC. Typing tools for the investigation of epidemic fungal infection. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 1-9.
- 110.- Huben H, Hauck H. Characterization of Candida albicans strains found in patients of three intensive care units. *Mycoses* 1988; 31: 418-422.
- 111.- Hughes CE, Bennett RL, Beggs WH. Broth dilution testing of Candida albicans susceptibility to ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 643-646.
- 112.- Hunter PR, Fraser C. Use of modified resistogram to type Candida albicans isolated from cases of vaginitis and from faeces in the same geographical area. *J Clin Pathol* 1987; 40: 1159-1161.
- 113.- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-2466.
- 114.- Hunter PR, Fraser CAM, Mackenzie DWR. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J Med Microbiol* 1989; 28: 85-91.
- 115.- Hunter PR, Fraser CAM. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for Candida albicans. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2156.
- 116.- Hunter PR, Fraser CAM. Application of the theory of adaptive polymorphism to the ecology and epidemiology of pathogenic yeasts. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 2219-2222.

- 117.- Hunter PR, Harrison GAJ, Fraser CAM. Cross-infection and diversity of Candida albicans strain carriage in patients and nursing staff on an intensive care unit. J Med Vet Mycol 1990; 28: 317.
- 118.- Hunter PR, Campbell CK. Comparison of three classification techniques on a population of medically important yeasts. Binary 1991; 3: 121-126.
- 119- Hunter PR. A critical review of typing methods for Candida albicans and their applications. Critical Rev Microbiol 1991; 17: 417-434.
- 120.- Hussain SMH, Flournoy DJ, Qadri SGM, Ramirez EG. Susceptibility of clinical isolates of yeasts to anti-fungal agents. Mycopathologia 1986; 95: 183-187.
- 121.- Jevons S, Gymer GE, Brammer KW. Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349) a new imidazole derivative. Antimicrob Agents Chemother 1979; 15: 597-602.
- 122.- Jue SG, Dawson GW, Brogden RN. Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. Drugs 1985; 29: 330-341.
- 123.- Kahn FW, Jones JM. Latex agglutination tests for detection of Candida antigens in sera of patients with invasive candidiasis. J Infect Dis 1986; 153: 579-585.
- 124.- Kassamali K, Anaissie E, Ralston K, Kantarjia H, Fainstein V, Bodey GP. Disseminated Geotrichum candidum infection. J Clin Microbiol 1987; 25: 1782-1783.
- 125.- Kaufmann CS, Merz WC. Electrophoretic karyotypes of Torulopsis glabrata. J Clin Microbiol 1989 27: 2165-2168.
- 126.- Kennedy MJ. Adhesion and association mechanisms of Candida albicans. En: McGinnis MR (Ed). Current Topics in Medical Mycology. Springer-Verlag. New York: 1988; pp: 73-169.
- 127.- Kiehn TE, Edwards FF, Tom D, Lieberman G, Bernard EM, Armstrong D. Evaluation of the Quantum II yeast identification system. J Clin Microbiol 1985; 22: 216-219.
- 128.- Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR. Fungemia cause by Candida species and Torulopsis glabrata in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Infec Dis 1989; 11: 379-390.

- 129.- Korting HC, Ollert M, Georgi A, Fröschl M. In vitro susceptibilities and biotypes of Candida albicans isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 1988; 26: 2626-2631.
- 130.- Korting HC. Clinical Spectrum of oral candidosis and its role in HIV-infected patients. Mycoses 1989; 32: 23-29.
- 131.- Kovacovska R, Kockova-Kratochvilova A, Chvatalova M, Svorcova L. The occurrence of yeast-like organisms in human bile. Mycoses 1988; 31: 356-362.
- 132.- Kreger-van Rij NJW. The Yeasts: a taxonomic study. 1984, 3rd edition. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- 133.- Kurtz MB, Kirsch DR, Kelly R. The molecular genetics of Candida albicans. Microbiol Sci 1988; 5: 58-63.
- 134.- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var neoformans (serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var gattii (serotypes B and C). J Clin Microbiol 1982; 15: 535-537.
- 135.- Kwon-Chung KJ, Tom WK, Costa JL. Utilization of indole compounds by Cryptococcus neoformans to produce a melanin-like pigment. J Clin Microbiol 1983; 18: 1419-1421.
- 136.- Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Salkin IF, Kotz HL, Sobel JD. Is Candida stellatoidea disappearing from the vaginal mucosa? J Clin Microbiol 1990; 28: 600-601.
- 137.- Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. J Clin Microbiol 1979; 10: 357-364.
- 138.- Land GA, Stotler R, Land K, Staneck J. Update and evaluation of the AutoMicrobic yeast identification system. J Clin Microbiol 1984; 20: 649-652.
- 139.- Land GA, Salkin IF. Uncommon yeaslike zoopathogens and commercial systems for their identification. Mycopathologia 1987; 99: 155-171.
- 140.- Land GA, Salkin IF, El-Zaatari M, McGinnis MR, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. J Clin Microbiol 1991;

29: 718-722.

141.- LaRocco M. Infections caused by the Genus Malassezia. *Infec Dis News* 1988; 7: 1-4.

142.- Lee W, Burnie J, Matthews R. Fingerprinting Candida albicans. *J Immunol Methods* 1986; 6, 93: 177-182.

143.- Lee JW, Melcher GA, Rinalde MG, Pizzo PA, Walsh TJ. Patterns of morphologic variation among isolates of Trichosporon beigeli. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2823-2827.

144.- Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of Malassezia furfur from human skin. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2017-2019.

145.- Lefler E, Stevens DA. Inhibition and killing of Candida albicans in vitro by five imidazoles in clinical use. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 450-454.

146.- Lehman PF, WU L, Mackenzie DWR. Isoenzyme changes in Candida albicans during domestication. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2623-2625.

147.- Levitz SM. The ecology of Cryptococcus neoformans and the epidemiology of Cryptococcosis. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1163-1169.

148.- Lode H, Hoffken G. Oral candidosis and its role in immunocompromised patients. *Mycoses* 1989; 32: 30-33.

149.- Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine* 1986. George Stamathis (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore.

150.- Luria DB, Lavenhar M, Kaminski T, Eng RHK. Garlic (Allium sativum) in the treatment of experimental cryptococcosis. *J Med Vet Mycol* 1989; 27: 253-256.

151.- Lutwick LI, Phatt HJ. Kluyveromyces fragilis as an opportunistic fungal pathogen in man. *Sabouraudia* 1980; 18: 69-73.

152.- Macani JE. Rapid presumptive identification of Cryptococcus neoformans by staphylococcal coagglutination. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 828-832.

153.- Macher AM, De Vinatea ML, Tuur SM, Angritt P. AIDS and the mycoses. En: *Systemic fungal infections: diagnosis and treatment I*. Infectious disease clinics of north



America 1988; 2: 827-840. DJ Drutz Guest Editor. WB Saunders company.

154.- Maffei C, Manso E, Biavasco F, Varaldo PE, Moro ML. Typing and nosocomial candidiasis. J Clin Microbiol 1990; 28: 1086-1087.

155.- Magee BB, D'souza TM, Magee PT. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of Candida species. J Bacteriol 1987; 169: 1639-1643.

156.- Magee BB and Magee PT. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in Candida species. J Gen Microbiol 1987; 133: 425.

157.- Mahrous M, Lott TJ, Meyer SA, Sawant AD, Aheatn DG. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical Candida albicans. J Clin Microbiol 1990; 28: 876.

158.- Manning-Zweerink M, Maloney CS, Mitchell TG, Weston H. Immunoblot analyses of Candida albicans associated antigens and antibodies in human sera. J Clin Microbiol 1986; 23: 46-52.

159.- Mallié M, Montés B, Lebecq JC, Bastide J-M. In vitro antifungal activity of sarpeconazole (R66905) against Candida and Torulopsis. Mycoses 1989; 32: 631-637.

160.- Marcon MJ, Powell DA. Malassezia furfur. Clin Microb News 1988; 10: 41-48.

161.- Martin MV, Lamb DJ. Frequency of Candida albicans serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. J Clin Pathol 1982; 35: 888.

162.- MASON MM, LASKER BA, RIGGSBY WS. Molecular probe for identification of medically important Candida species and Torulopsis glabrata. J Clin Microbiol 1987; 25: 563-566.

163.- Matthews RC, Burnie JP, Fox A, Woods M, Tabaqchali S. Immunoblot analysis of the serological response in invasive Trichosporon beigelii and Blastoschizomyces capitatus infections. J Clin Microbiol 1986; 23: 395-397.

164.- Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S. Isolation of immunodominant antigens from sera of patients with systemic candidiasis and characterization of serological response to Candida albicans. J Clin Microbiol 1987; 25: 230-237.

165.- Matthews R, Smith D, Midgley J, Burnie J, Clark I, Conolly M. Candida and AIDS:

evidence for protective antibody. Lancet 1988; i: 263-265.

166.- Matthews R, Burnie J. Assessment of DNA fingerprinting for rapid identification of outbreaks of systemic candidiasis. Br Med J 1989; 298: 354-357.

167.- McCreight MC, Warnock DW. Enhanced differentiation of isolates of Candida albicans using a modified resistogram method. Mykosen 1982; 25: 589-598.

168.- McCreight MC, Warnock DW, Watkinson AC. Prevalence of different strains of Candida albicans in patients with denture-induced stomatitis. Sabouraudia 1984; 22: 83-85.

169.- McCreight MC, Warnock DW, Martín MV. Resistogram typing of Candida albicans isolates from oral and cutaneous sites in irradiated patients. Sabouraudia 1985; 23: 403-406.

170.- McGinnis MR, Ajello L, Beneke ES, Drouhet E, Goodman NL, Halde CJ, Haley LD, Kane J, Land GA, Padhye AA, Pincus DH, Rinaldi MG, Rogers AL, Salkin IF, Schell WA, Weitzman I. Taxonomic and nomenclatural evaluation of the Genera Candida and Torulopsis. J Clin Microbiol 1984; 20: 813-814.

171.- McGinnis MR. Names of medically important yeasts. Clin Microb News 1987; 9: 92-93.

172.- McGowan KL, Mortensen JE. Identification of clinical yeast isolates by using the microring YT. J Clin Microbiol 1991; 31: 185-187.

173.- McIntyre KA, Galgiani JN. PH and other effects on the antifungal activity of cilofungin (LY 121019). Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 731-735.

174.- Merz WG, Karp JE, Schron D, Saral R. Increased incidence of fungemia caused by Candida krusei. J Clin Microbiol 1986; 24: 581-584.

175.- Meunier-Carpentier, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host. Changing patterns, antigenemia, high mortality. Am J Med 1981; 71: 363.

176.- Meunier F, Aoun M, Bitar N. Fungal infections in immunocompromised hosts. Candidemia in immunocompromised patients. Clin Infect Dis 1992; 14: S120-S125.

177.- Miro JM, Puig de la Bellacasa J, Odds FC, Gill BK, Bisbe J, Gatell JM, Gonzalez J, Latorre X, Jimenez de Anta MTJ, Soriano E, García San Miguel J. Source of the infection

- in an outbreak systemic candidiasis in Spanish heroin addicts. *J Infect Dis* 1987; 156: 857-858.
- 177a.- Mishra P, Kaur S. Concepts on candidal virulence. *Rev Med Microbiol* 1992; 3: 168-174.
- 178.- Mochizuki T, Sugiura H, Watanabe S, Takada M, Hodohara K, Kushima R. A case of disseminated trichosporonosis: a case report and immunohistochemical identification of fungal elements. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 343-349.
- 179.- Monod M, Porchet S, Baudraz-Rosset F, Frenk E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J Med Microbiol* 1990; 32: 123-129.
- 180.- Morales C, Nogueira JM, García de Lomás J. Candidiasis diseminada: problemas diagnósticos actuales y perspectivas futuras. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1988; 6: 107-113.
- 181.- Morales C, García de Lomás J, Grau MA, Mir A, Nogueira JM. Candidiasis diseminada. Estudio experimental II. Detección de antígenos manano en líquidos biológicos (suero y orina) por inhibición de un ELISA-indirecto. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1988; 6: 89-94.
- 182.- Morales C, Grau MA, Mir A, Nogueira JM, García de Lomás J. Detección de antígeno manano de Candida albicans A in vitro por inhibición de un ELISA-indirecto. *Enf Inf y Microbiol Clin* 1988; 6: 70-76.
- 183.- Morgan MA, Wilkowske CJ, Roberts GD. Candida pseudotropicalis fungemia and invasive disease in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1006-1007.
- 184.- Moro ML, Maffei C, Manso E, Morace G, Polonelli L, Biovasco F. Nosocomial outbreak of systemic candidosis associated with parenteral nutrition. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990; 11: 27-35.
- 185.- Muñoz P, Bernaldo de Quirós JCL, Berenguer J, Rodríguez Creixems, Picazo JJ, Bouza E. Impact of the BACTEC NR system in detecting Candida fungemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 639-641.
- 186.- Murphy N, Buchaman CR. Infection and colonization of neonates by Hansenula anomala. *Lancet* 1986; 1: 291-293.

- 187.- Murray PR. Comparison of the Lysis-Centrifugation and Agitated Biphasic Blood Culture for detection of Fungemia. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 96-98.
- 188.- Murray PR, Traynor P, Hopson D. Critical assessment of blood culture techniques: analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1462-1468.
- 189.- Negroni P. Variación hacia el tipo R de Mycotorula albicans. *Rev Soc Argentina Biol* 1935; 11: 449.
- 190.- Oblack DI, Rhodes JC, Martin WJ. Clinical evaluation of the automicrobic system yeast biochemical card for rapid identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 351-355.
- 191.- O'Connor MI, Sobel JD. Epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis: identification and strain differentiation of Candida albicans. *J Infect Dis* 1986; 154: 358.
- 192.- O'Day D, Head WS, Robinson RD. An outbreak of Candida parapsilosis endophthalmitis: analysis of strains by enzyme profile and antifungal susceptibility. *Br J Ophthalmology* 1987; 71: 126-129.
- 193.- Odds FC, Abbott AB. A simple method for the presumptive identification of Candida albicans and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia* 1980; 18: 301-317.
- 194.- Odds FC, Abbott AB. Modification and extension of tests for differentiation of Candida species and strains. *Sabouraudia* 1983; 21: 79.
- 195.- Odds FC, Abbott AB, Reed TAG, Eilmott FE, Candida albicans Strain types from the genitalia of patients with and without Candida infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1983; 15: 37.
- 196.- Odds FC, Abbott AB, Stiller RL, Scholer HJ, Polak A, Stevens DA. Analysis for Candida albicans phenotypes from different geographical and anatomical sources. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 849.
- 197.- Odds FC. Biotyping of Medically important fungi. En: *Current topics in medical mycology* 1985; 1: 155-171. Ed MR McGinnis. Springerberlag. N York.
- 198.- Odds FC, Palacio-Hernanz A, Cuadra J, Sanchez J. Disseminated Candida infection

- syndrome in heroin addicts-dominance of a single C. albicans biotype. M Med Microbiol 1987; 23: 275-277.
- 199.- Odds FC. *Candida* and candidosis. A review and bibliography 1988 2nd ed. Baillière Tindall. WB Saunders.
- 200.- Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. J Med Vet Mycol 1988; 26: 277-283.
- 201.- Odds FC, Klibbler CC, Walker E, Bhamra A, Prentice HG, Noone P. Carriage of candida species and C. albicans biotypes in patients undergoing chemotherapy or bone marrow transplantation for haematological disease. J Clin Pathol 1989; 42: 1259-1266.
- 202.- Odds FC, Auger P, Krogh P, Neely AN, Segal E. Biotyping of Candida albicans; results of an international collaborative survey. J Clin Microbiol. 1989; 27: 1506-1509.
- 203.- Odds FC, Merson-Davies LA. Colony variations in Candida species. Mycoses 1989; 32: 275-282.
- 204.- Odds FC, Webster CE, Fisk PG, Riley VC, Mayuranathan P, Simmons PD. Candida species and C. albicans biotypes in women attending clinics in genitourinary medicine. J Med Microbiol 1989; 29: 51-55.
- 205.- Odds FC. Quantitative microculture system with standardized inocula for strain typing, susceptibility testing, and other physiologic measurements with Candida albicans and other yeasts. J Clin Microbiol 1991; 29: 2735-2740.
- 206.- Olsen I. Chemotaxonomy of yeast. Acta Odontol Scand 1990; 48: 19-25.
- 207.- Osawa H, Moriyama K, Fujimoto K, Moriyama Y. Pharmacokinetic studies of 6-cyclohexyl-1-hydroxy-4-methyl-2(1H)-pyridone ethanolamine salt (HOE 296) in rats. Pharmacometrics 1975; 9: 109-115.
- 208.- Padhye AA. Susceptibility tests and blood level determinations of antimycotic agents. 1980. En: Manual of Clinical Microbiology. pp 1166-1173. Ed: Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Truant JP. American Society for Microbiology. Washington DC.
- 209.- Del Palacio A, Bartlett A, Sanz F, Muelas M, Rodriguez-Noriega A. ketoconazol en

candidiasis vulvovaginal. *Toko-Gin Pract* 1981; 40: 241-244.

210.- Palmer GC, Ordy MJ, Simmons RD, Strand JC, Radov LA, Mullen GB, Kinsolving CR, Georgiev VS, Mitchell JT, Allen SD. Selection of orally active antifungal agents from 3,5-substituted isoxazolidine derivatives based on acute efficacy-safety profiles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33: 895-905.

211.- Payne AL, Teall AJ. Trichosporon beigelii infection in an immunocompromised host. *Mycoses* 1989; 32: 183-186.

212.- Perfect JR. Cryptococcosis. En: *Infectious disease clinics of north America. Systemic fungal infections: diagnosis and treatment II* 1989; 3: 77-102. WB Saunders company. Harcourt Brace Jovanovich Inc. Philadelphia.

213.- Perfect JR. Fluconazole therapy for experimental cryptococcosis and candidiasis in the rabbit. *Rev Infec Dis* 1990; 12: S299-S302.

214.- Perfect JR, Pickard WW, Hunt DL, Palmer B, Schell WA. The use of amphotericin B in nosocomial fungal infection. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 474-479.

215.- Perry JL, Miller GR, Carr DL. Rapid, colorimetric identification of Candida albicans. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 614-615.

216.- Pfaller MA. Strain variation among Candida species application of various typing methods to study the epidemiology and pathogenesis of candidiasis in hospitalized patients. *Infect Control* 1987; 8: 273-276.

217.- Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. Multicenter evaluation of four method of yeast inoculum preparation. *J Med Microbiol* 1988; 26: 1437-1441.

218.- Pfaller M. Infection control: opportunistic fungal infection the increasing importance of Candida species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989; 10: 270-273.

219.- Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Hughes CE, Odds FC, Sugar AM. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1648-1654.

219a.- Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the

1990s. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 287-291.

220.- Phelps M, Aylife GAT, Babbs JR. An outbreak of candidiasis in a special baby unit: the use of a resistogram typing method. J Hosp Infect 1986; 7: 13-20.

221.- Phongpaichit S, Mackenzie DWR, Fraser C. Strain differentiation of Candida albicans by morphotyping. Epidem Inf 1987; 99: 421-428.

222.- Pincus DH, Salkin IF, Hurd NJ, Levy IL, Kemna MA. Modification of potassium nitrate assimilation test for identification of clinically important yeasts. J Clin Microbiol 1988; 26: 366-368.

223.- Poirier S, Auger P, Joly J, Steben M. Interest of biotyping Candida albicans in chronic vulvovaginitis. Mykosen 1990; 33: 24-28.

224.- Polak A. Antifungal-quinolone interaction in vitro and in vivo. Mykosen 1990; 33: 173-178.

225.- Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. Killer system: a simple method for differentiating Candida albicans strains. J Clin Microbiol 1983; 17: 774-780.

226.- Polonelli L, Morace G. A microautomated dilution method for susceptibility testing with antifungal drugs. Mycopathologia 1984; 86: 21-28.

227.- Polonelli L, Morace G. Specific and common antigenic determinants of Candida albicans isolates detected by monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1986; 23: 366.

228.- Polonelli L, Morace G. Yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. J Clin Microbiol 1988; 26: 602-604.

229.- Polonelli L, Conti S, Magliani W, Morace G. Biotyping of pathogenic fungi by killer system and with monoclonal antibodies. Mycopathologia 1989; 107: 17-23.

230.- Ponton J, Cisterna R. ¿Es posible un diagnóstico serológico rápido y específico de la candidiasis sistémica?. Enf Inf y Microbiol Clin 1988; 6: 61-65.

231.- Pontón J, Regúlez P, Quingós G, Cisterna R. La composición antigénica de Candida albicans y su aplicación al diagnóstico de las candidiasis. Rev Iberoam Micol 1990; 7: 122-132.

- 232.- Pore RS, Chen J. Meningitis caused by Rhodotorula. *Sabouraudia* 1976; 14: 331-335.
- 233.- Quindós G, Scheider J, Alvarez M, Pontón J, Cisterna R. Antibodies against Trichosporon beigelii in vaginal washing from asymptomatic women. *J Med Microbiol* 1989; 28: 223-225.
- 234.- Quindós G, Pontón J, Cisterna R, Mackenzie DWR. Value of detection of antibodies to Candida albicans germ tube in the diagnosis of systemic candidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9 (3): 178-183.
- 235.- Quindós G, Rowe IF, Higgens CS, Pontón J, Cisterna R, Mackenzie WR. Candidal infection of bone. Assessment of serologic tests in diagnosis and managements. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 297-302.
- 236.- Quindós G, Fernández-Rodríguez M, Burgos A, Tellaetxe M, Cisterna R, Pontón J. Colony morphotype on Sabouraud-Triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for Candida subspecies discrimination. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2748-2752.
- 237.- Radetsky M, Wheeler RC, Roe MH, Todd JK. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 600-606.
- 238.- Rajakumar R, Lacey CJN, Evans EGV, Carney JA. Use of slide latex agglutination test for rapid diagnosis of vaginal candidosis. *Genitourin Med* 1987; 63: 192-195.
- 239.- Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2733-2738.
- 240.- Richardson K, Cooper K, Marriott MS, Tarbit MH, Troke PF, Whittle PJ. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. *Rev Infec Dis* 1990; 12: S267-S271.
- 241.- Rinaldi MG. Emerging opportunists. En: *Infectious disease clinics of north America. Systemic fungal infections: diagnosis and treatment II* 1989; 3: 65-76. WB Saunders company. Harcourt brace Jovanovich, Inc, Philadelphia.
- 242.- Rippon JW. Symposium on medical mycology: the new opportunistic fungal infections, diagnosis, isolation, identification and impact on mycology. Fear of fungi. *Mycopathología* 1987; 99: 143-146.

- 243.- Rippon JW. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes 1988 3rd ed. WB Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich, Inc, Philadelphia.
- 244.- Roberts GD, Horstmeier CD, Land GA, Foxworth JH. Rapid urea broth test for yeasts. J Clin Microbiol 1978; 7: 584-588.
- 245.- Roberts JE. Genital candidiasis. The Physician 1984; 534-537.
- 246.- Roberts FJ, Geere IW, Coldman A. A three-year study of positive blood cultures, with emphasis on prognosis. Rev Infec Dis 1991; 13: 34-46.
- 247.- Rodríguez-Tudela JL, Aviles P. Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. J Clin Microbiol 1991; 29: 2604-2605.
- 248.- Rogers TE, Galgiani JN. Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against Candida albicans in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30: 418-422.
- 249.- Rotowa NA, Shadomy HJ, Shadomy S. In vitro activities of polyene and imidazole antifungal agents against unusual opportunistic fungal pathogens. Mycoses 1990; 33: 203-211.
- 250.- Rusthoven JJ, Feld R, Tuffnell PG. Systemic infection by Rhodotorula spp in the immunocompromised host. J Infect 1984; 8: 241-246.
- 251.- Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of Candida albicans. J Bacteriol 1990; 172: 1276.
- 252.- Sadhu C, McEachern MJ, Rustchenko-Bulgac EP, Schmid J, Soll DR, Hicks JB. Telomeric and dispersed repeat sequences in Candida yeasts and their use in strain identification. J Bacteriol 1991; 173: 842-850.
- 253.- Salkin IF. New medium for differentiation of Candida albicans from Candida stellatoidea. J Clin Microbiol 1979; 9: 551-553.
- 254.- Salkin IF, Hurd NJ. New medium for differentiation of Cryptococcus neoformans serotype pairs. J Clin Microbiol 1982; 15: 169-171.
- 255.- Salkin IF, Schadow KH, Bankaitis LA, McGinnis MR, Kemna ME. Evaluation of Abbott Quantum II yeast identification system. J Clin Microbiol 1985; 22: 442-444.

- 256.- Salkin IF, Land GA, Hurd NJ, Goldson PR, McGinnis MR. Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 624-627.
- 257.- Saló J, Ribera JM, Bladé J, Puig de la Bellacasa J, Nomdedeu B, Grañera A, Rozman C. Sepsis por Candida parapsilosis. Afección articular y pulmonar en dos pacientes con leucemia aguda. *Med Clin* 1990; 94: 58-60.
- 258.- San-Blas G. Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Rev Iberoam Micol* 1991; 8: 24-34.
- 259.- Sánchez C, León MA, Capells, Pérez A, Planes A León C. Funguemia 1973-1983. Análisis de 67 pacientes. *Med Clin* 1985; 84: 549-553.
- 260.- Sanchez Rodríguez C, León C, León MA, Capell S, Pérez A. Candidiasis y candidemia. Reexamen de una problemática actual. *Med Clin* 1985; 85: 464-471.
- 261.- Sanchez V, Vazquez JA, Barth-Jones D, Demby L, Sober JD, Zerbos MJ. Epidemiology of nosocomial acquisition of Candida lusitanae. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3005-3008.
- 262.- Sanchez-Sousa A, Gomez-Criado C, Jimenez MC, Fernández-Jorge A, Baquero F. A replica plating technique for in vitro study of susceptibility of Candida albicans to miconazole, econazole and ketoconazole: some data for standardization. *Ann Inst Pasteur* 1985; 136A: 371-380.
- 263.- Sarosi GA, Armstrong D, Davies SF, George RB, Graybill JR, Pennington JE, Roberts GP, Stevens DA. Laboratory diagnosis of mycotic and specific fungal infections. *J Am Thor Soc* 1985; 1372-1379.
- 264.- Scherer S, Stevens Da. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of Candida species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-679.
- 265.- Schlitzer RL. Ahearn DG. Characterization of atypical Candida tropicalis and other uncommon clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 511-516.
- 266.- Schmid J, Voss E, Soll DR. Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in Candida albicans by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1236-1243.

- 267.- Schneider J, Vicandi J, Regulez P, Quindós G, Pontón J, Cisterna R. Different antibody response against Candida albicans cell wall antigens in cervicovaginal candidiasis. Gynecol Obstet Invest 1990; 30: 174-177.
- 268.- Scudamore J, Blatchforce N. Estudio abierto de panfungol en el tratamiento de la candidiasis vaginal recurrente. Clin Res Rev 1981; 1: 203-206.
- 269.- Shadomy S, Pfaller MA. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids, p. 1173-1183. In Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (ed). Manual of clinical microbiology, 5th ed. 1991. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 270.- Shankland GS, Hopwood V, Forster RA, Glyn E, Evans V, Richardson MD, Warnock DW. Multicenter evaluation of Microring YT, a new method of yeast identification. J Clin Microbiol 1990; 28: 2808-2810.
- 271.- Shawar R, Paetznick V, Witte Z, Garnsey L, Anaissie E, LaRocco M. collaborative investigation of broth microdilution and semisolid agar dilution for in vitro susceptibility testing of Candida albicans. J Clin Microbiol 1992; 30: 1976-1981.
- 272.- Shepherd MG. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. The New Zealand Dental Journal 1986; 82: 78-81.
- 273.- Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in Candida albicans. Science 1985; 230: 666.
- 274.- Smith RA, Hitchcock, Evans EGV, lacey CJN, Adam DJ. The identification of Candida albicans strains by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA. J Med Vet Mycol 1989; 27: 431-434.
- 275.- Snell RG, Wilkins RJ. Separation of chromosomal DNA molecules from C. albicans by pulsed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 1986; 14: 4401-4406.
- 276.- Snell RG, Hermans IF, Wilkins RJ, Corner BE. Chromosomal variations in Candida albicans. Nucleic Acids Res 1987; 15: 3625.
- 277.- Sobczak H. A simple disk-diffusion test for differentiation of yeast species. J Med Microbiol 1985; 20: 307-316.

- 277a.- Sokal RR, Rahlf FJ. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. 1979, H Blume ediciones. Madrid.
- 278.- Soll DR, Staebell M, Langtimm C, Pfaller M, Hicks J, Gopala TV. Multiple Candida strains in the course or a single systemic infection. J Clin Microbiol 1988; 26: 1448-1459.
- 279.- Soll DR, Galask R, Isley S, Rao TVG, Stone D, Hicks J, Schmid J, Mac K, Hanna C. Switching of Candida albicans during succesive episodes of recurrent vaginitis. J Clin Microbiol 1989; 27: 681-690.
- 280.- Soll DR. High-Frequency switching in Candida albicans. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 183-203.
- 281.- Stein DK, Sugar AM. Fungal infections the immunocompromised host. Diagn Microbiol Infect Dis 1989; 12: 221S-228S.
- 282.- Stenderup A. Ecology of yeast and epidemiology of yeast infections. Acta Derm Venereol 1986; suppl 121: 27-37.
- 283.- Stevens DA, Odds FC, Scherer S. Application of DNA typing methods to Candida albicans epidemiology and correlation with phenotype. Rev Infect Dis 1990; 12: 258-266.
- 284.- Syverson RE. Variable assimilation of carbon compounds by Candida albicans. J Clin Microbiol 1981; 13: 163-166.
- 285.- Tolman EL, Isoacson DM, Rosenthale ME, McGuire JL, Van Cutsem J, Borgers M, Vanden H. Anticandidal activities of terconazole, a broad-spectrum antimycotic. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 986-991.
- 286.-Tomsikova A, Vraná D, Kotál L. Biotyping of Candida strains with regard to the epidemiology of candidosis. A practical approach. Mycoses 1990; 33: 527-537.
- 287.- Torres-Rodriguez JM, Carrillo-Muñoz A, Gallach-Bau C, Madrenys N. Susceptibility of Candida species to cilofungin (LY-121019). Mycoses 1989; 32: 316-318.
- 288.- Torres-Rodriguz JM, Sabaté M, Gallach C, Carrillo A, Madrenys N. Sensibilidad in vitro a la 5-fluorocitosina y anfotericina B de levaduras del género Candida aisladas en Barcelona. Enf Inf y Microbiol Clin 1990; 8: 91-93.

- 289.- Torssander J, Morfeldt-Manson L, Biberfeld G, Karlsson A, Putkonen P, Wasserman J. Oral Candida albicans in HIV infection. Scand J Infect Dis 1987; 19: 291-295.
- 290.- Troke PF, Andrews RJ, Pye GW, Richardson K. Fluconazole and other azoles: translation of in vitro activity to in vivo and clinical efficacy. Rev Infect Dis 1990; 12: S276-S280.
- 291.- Van Cutsem J, Van Gerven F, Zaman RM, Janssen PAJ. Terconazole -a new broad-spectrum antifungal. Chemotherapy 1983; 29: 322-331.
- 292.- Van Cutsem J. The in vitro antifungal spectrum of itraconazole. Mycoses 1989; 32: 7-13.
- 293.- Van't Wout JW, Mattie H, Van Furth R. Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against a systemic Candida albicans infections in normal and neutropenic mice. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 147-151.
- 294.- Vaqué J, Rosselló J, Campins M, Passarell MA, Esteve M, Albiol E, Sala r, Ota J. Prevalencia de las infecciones en un hospital medicoquirúrgico de tercer nivel (I). Infecciones y factores de riesgo. Med Clin 1987; 89: 355-361.
- 295.- Vaudry W, Tierney J, Wenman WM. Investigation of a cluster of systemic Candida albicans infections in a neonatal intensive care unit. J Infect Dis 1988; 158: 1375-1379.
- 296.- Vazquez JA, Ceckley A, Sober JD, Zervos MJ. Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for Candida albicans. J Clin Microbiol 1991; 29: 962-967.
- 297.- Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. J Bacteriol 1990; 172: 4238-4246.
- 298.- Walsh TJ. Trichosporonosis. En Infectious disease clinics of north America. Systemic fungal infections diagnosis and treatment II 1989; 3 (1): 43-52. WB Saunders company. Harcourt Brace Jovanovich, Inc, Philadelphia.
- 299.- Walsh TJ, Salkin IF, Dixon DM, Hurd NJ. Clinical, Microbiological, and experimental animal studies of Candida lipolytica. J Clin Microbiol 1989; 27: 927-931.
- 300.- Warnock DW, Speller DCE, Day JK, Farrell AJ. Resistogram method for differentiation

of strains of Candida albicans. J Appl Bacteriol 1979; 46: 571.

301.- Warnock DW, Speller DCE, Milne JD, Hilton AL, Kershaw PI. Epidemiological investigation of patients with vulvovaginal candidiasis: application of a resistogram method for strain differentiation of Candida albicans. Br J Brnrt fid 1979; 55: 357.

302.- Washington JA, Shuther VL. 1980. Dilution susceptibility tests: agar and macrobroth dilution procedures, pp. 453-458. En: Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Truant JP (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC.

303.- Watson KC, Killichurum K. Brain abscess due to Trichosporon cutaneum. J Med Microbiol 1970; 3: 191-193.

304.- Weber DJ, Rutala WA. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Current topics in medical micology 1988; 2: 305-337. Ed MR McGinnis. Springer-Verlag N York.

305.- Weems JJ. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 1992; 14: 756-766.

306.- Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attribute mortality and excess length of stay. Arch intern Med 1988; 148: 2642-2645.

307.- Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Biotypes of oral Candida albicans and Candida tropicalis isolates. J Med Vet Mycol. 1986; 24: 81-84.

308.- Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. A new simple method for biotyping Candida albicans. Microbios 1987; 51: 159-167.

309.- Zatón A, Quindós G, Pontón J. Determination of monosaccharides by high-performance liquid chromatography 1990; 525: 169-175.

310.- Zimmer BL, Roberts GD. Rapid selective urease test for presumptive identification of Cryptococcus neoformans. J Clin Microbiol 1979; 10: 380-381.