

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

LA ACCION DE LA 5-FLUOR-CITOSINA SOBRE LAS LEVADURAS
ENDOSAPROFITAS Y EL AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS.

por

Leonor Carrillo

Trabajo de Adscripción a la Cátedra de Micología y Parasitología

1975

A mis padres

I.- Introducción	3
II.- Revisión bibliográfica	
a.- Los hongos patógenos	4
b.- Las levaduras en los materiales clínicos	5
c.- La 5-fluor-citosina	9
III.- Materiales	17
IV.- Métodos	
1.- Aislamiento de las levaduras	17
2.- Identificación de las levaduras	
A.- Estudio de las características morfológicas	18
B.- Estudio de las características fisiológicas	18
3.- Ensayos con 5-fluor-citosina.	19
4.- Aislamiento de los hongos patógenos presentes en materiales clínicos.	21
V.- Resultados	
1.- Aislamiento e identificación de las levaduras	21
2.- Acción de la 5-fluor-citosina	26
VI.- Conclusiones	37
VII.- Bibliografía	38

LA ACCION DE LA 5-FLUOR-CITOSINA SOBRE LAS LEVADURAS
ENDOSAPROFITAS Y EL AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS.

por Leonor Carrillo^o

Trabajo de Adscripción a la Cátedra de Micrología y Parasitología,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

I.- INTRODUCCION

Los objetivos del presente trabajo son:

a) Conocer la sensibilidad a la 5-fluor-citosina de un centenar de cepas de levaduras endosaprófitas aisladas de esputo y otros materiales relacionados.

b) Comprobar la eficacia de la 5-fluor-citosina para inhibir el crecimiento de esas levaduras durante el aislamiento de los hongos patógenos sin afectar a estos últimos.

^o) Doctora en Ciencias Químicas (orientación biológica)

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

a.- Los hongos patógenos

Con el término 'patógeno' designamos aquí al hongo cuyo aislamiento a partir del material clínico ya indica enfermedad, por ejemplo Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis. Estos hongos tienen una morfología parasitaria diferente a la saprófita. Cultivados sobre el medio de Sabouraud a 28°C toman la forma filamentosa, pero es posible obtener in vitro la forma parásita sembrándolos sobre los medios ricos en proteínas y a 37°C. El hongo puede pasar de una a otra forma modificando la temperatura y la composición del medio de cultivo.^{39,40}

Todos los hongos patógenos crecen fácilmente sobre el medio de Sabouraud. Los otros medios, tales como el de Sabouraud con sangre o el agar con infusión de cerebro y corazón, no son indispensables para el aislamiento pero pueden contribuir al mismo.

Para sembrar los esputos suele emplearse un agente mucolítico que permita concentrar los elementos fúngicos, tal como el ditiotretol al 0,1%²⁰ o la N-acetil-L-cisteína⁴⁶, los que no afectan al crecimiento normal de los hongos. Las sustancias antibacterianas, tales como el cloranfenicol (16 µg/ml) y la gentamicina (5 µg/ml), favorecen el aislamiento por la inhibición del crecimiento de las bacterias que suelen estar presentes en las muestras de esputo.¹⁵ La cicloheximida (0,5 mg/ml) impide el desarrollo de muchos mohos cuyos esporos se hallan en el aire de las habitaciones y suelen contaminar accidentalmente los materiales, pero puede alterar levemente la apariencia microscópica de las colonias de los patógenos.^{50,19}

El aislamiento de los hongos patógenos suele ser dificultoso por

el desarrollo de las levaduras endosaprófitas. Kapica y colaboradores ²⁷ demostraron que, sobre el medio de Sabouraud, diez colonias de Candida albicans fueron suficientes para impedir el desarrollo de unas 50.000 elementos potencialmente viables de H. capsulatum, debido a la disminución del pH. También el P. brasiliensis es muy sensible a la acidez, especialmente en la forma levadura. ⁴⁸ Por esto, cuando se intenta aislar hongos patógenos de las muestras que contienen levaduras endosaprófitas, conviene utilizar medios pobres en sólidos.

El medio de Smith que contiene 0,1% de extracto de levadura como única fuente nutritiva, fué empleado por Omiecznycki y colaboradores ⁴² para el aislamiento del C. inimitis, por Conti Díaz ¹¹ para el del H. capsulatum y por Restrepo y Correa ⁴⁹ para el del P. brasiliensis. Este medio favorece la esporulación de la forma filamentosas, pero disminuye la velocidad de crecimiento.

²⁰ Harrison y Gordon usaron los medios de cultivo con 250 µg de 5-fluorocitosina por ml, para el aislamiento del H. capsulatum agregado experimentalmente a los esputos contaminados con levaduras endosaprófitas y mohos ambientales resistentes a la cicloheximida.

b.- Las levaduras en los materiales clínicos

Con el término levaduras se designa a un grupo heterogéneo de hongos en los cuales predomina la forma unicelular. Los límites de este grupo son vagos y están sujetos a decisiones más o menos arbitrarias. Comprende unas 350 especies agrupadas en 39 géneros correspondientes a los Hemiascomycetes, Heterobasidiomycetes y Deuteromycetes, y se distinguen más por los caracteres fisiológicos que por los morfológicos. ³⁰

Entre las claves y tablas para la identificación de las levaduras se destaca la obra de Lodder y Kregor - van Rij³² (1952). Montrocher³⁷ en 1967 publicó un estudio taxonómico del género *Candida*.

A continuación damos la frecuencia de las especies de levaduras presentes en la cavidad oral, secreciones bronquiales y esputos, según diversos autores.

MATERIALES	Secreciones bronquiales	
Nº de CPAS	16	29
ESPECIES		
<u><i>Candida albicans</i></u>	87,6%	62 %
<u><i>C. guilliermondii</i></u>	6,2 "	
<u><i>C. suaveolens</i></u>	6,2 "	
<u><i>C. tropicalis</i></u>		7 "
<u><i>Geotrichum candidum</i></u>		13,8"
Misceláneas		17,2"
REFERENCIAS	Kolar ²⁹ 1958	Alteras y Tataru ² 1969

MATERIALES

Cavidad oral

Nº CEPAS	249	109	69	117	70	47
Especies						
<u>Candida albicans</u>	78,4 %	35,2 %	36,6 %	61,5 %	74,4 %	83,0 %
<u>C. catenulata</u>	0,4 %					
<u>C. guilliermondii</u>		3,2 %	4,2 %			
<u>C. humicola</u>		0,6 %				
<u>C. intermedia</u>		1,9 %	2,8 %			
<u>C. krusei</u>	2,4 %	13,8 %	8,5 %	1,7 %		4,25 %
<u>C. macedoniensis</u>	0,8 %					
<u>C. mesentérica</u>		0,6 %				
<u>C. monosa</u>		0,6 %				
<u>C. mycoderma</u>	0,8 %					
<u>C. paransilosis</u>		1,3 %	4,2 %		1,4 %	
<u>C. pseudotropicalis</u>	2,0 %	19,5 %	8,5 %			4,25 %
<u>C. stellatoidea</u>		1,9 %	2,8 %			
<u>C. tropicalis</u>	3,2 %		15,6 %	1,7 %	1,4 %	
<u>Torulopsis candida</u>		2,5 %	2,8 %			
<u>T. elabrata</u>	12,0 %	3,2 %	5,6 %			6,38 %
<u>T. inconspicua</u>		2,5 %	1,4 %			
<u>Geotrichum sp.</u>				4,3 %	5,7 %	
<u>G. candidum</u>		10,0 %	5,6 %			
<u>Rhodotorula sp.</u>				0,9 %		
<u>R. mucilaginosa</u>		1,3 %				
<u>R. pulcherrima</u>		1,3 %				
<u>R. rubra</u>		0,6 %	1,4 %			
Miscelánea				29,9 %	17,1 %	2,12 %
Referencias	Budtz y Jorgensen 1972 ¹⁰	Kurnatowska 1969 ³¹	Dmochowska y Buluk 1971 ¹⁴	Hamilton- Miller 1972 ²¹		

MATERIALES	Esputos				
Nº de CEPAS	66	42	51	31	316
ESPECIES					
<u>Candida albicans</u>	77,2%	42,9%	41,2%	77,4%	69,8%
<u>C. brumptii</u>				9,7 "	
<u>C. guilliermondii</u>		14,2"	15,7"		
<u>C. krusei</u>	4,6 "				2,5 "
<u>C. parapsilosis</u>					1,3 "
<u>C. pseudotropicalis</u>					0,6 "
<u>C. stellatoidea</u>	10,6"	42,9"	43,1"		0,6 "
<u>C. tropicalis</u>	4,6 "				6,6 "
<u>C. seylanoides</u>				12,9"	
<u>Torulopsis clabrata</u>					14,5"
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>					2,5 "
Misceláneas					1,6 "
REFERENCIAS	Jen y ²⁴ colaborad. 1967	Lucien y ³⁴ colaboradores 1971	Bonfiglioli ⁸ y Longobardi 1956	Hamilton- Miller 1972	²¹

o.- La 5-fluor-citosina

La 5-fluorocitosina (5-FC) es un polvo cristalino, blanco, con un $PM = 129,1$, poco soluble en agua y muy soluble en alcohol. Este antimetabolito es inocuo para las células humanas y tiene acción antifúngica sobre algunas levaduras y mohos, pero no frente a ciertos patógenos como el H. capsulatum y el Blastomyces dermatitidis.^{26,17} La 5-FC entra en la célula por vía de la citosina - permeasa y luego es transformada en 5-fluor-uracilo por la citosina - deaminasa. El 5-fluor-uracilo es incorporado al ácido ribonucleico donde reemplaza al 20 a 40 % del uracilo, para dar un ARN fraudulento que afecta la síntesis de proteínas.^{25,44}

La 5-FC fue empleada con éxito en el tratamiento de las candidiasis pulmonar,²⁸ diseminada y urinaria;^{23,52} también en las infecciones causadas por Toxulopsis labrata,^{57,43} Cryptococcus neoformans,^{18,47} Cladosporium sp.,^{3,41} Phialophora pedrosoi y Aspergillus fumigatus.^{38,45} La dosis terapéutica utilizada es de 150 mg/kg/ día, administrada en cuatro veces, por vía oral durante varias semanas o meses. La 5-FC es detectada en el suero a los 30 minutos de su ingestión, alcanzando la mayor concentración (50 a 75 $\mu\text{g/ml}$) entre las 4 y 6 horas después. En el líquido cefalo-raquídeo los niveles son el 60 a 80 % de los hallados simultáneamente en el suero. Durante un período de 24 horas siguiente a la ingestión de la droga, se elimina el 90% con la orina, pero no se la encuentra en las heces.^{26,17,22}

Las técnicas empleadas en la determinación de la sensibilidad 'in vitro' a la 5-FC varían en la composición de los medios de cultivo, el tamaño del inóculo, el período y la temperatura de incubación, como se indica en cuadro siguiente.

ESPECIES	N°de CEPAS		Concentración inhibitoria 5-FC (µg/ml)	METODO de DILUCION en tubo
	total	sensibles		
(1) <u>Cr. neoformans</u>	18	14	≤ 3,9	medio base nitrogenado + l-asparagina + glucosa pH 7,4 - inóculo: 5x10 ⁶ células/ml de medio de cultivo incubación: 48 hs a 37°C
		4	≥ 1.000	
	<u>Sacch. cerevisiae</u>	1	0,03	
<u>C. albicans</u>	6	3	≤ 3,9	
		3	≥ 1.000	
<hr/>				
<u>Cr. neoformans</u>	6	3	≤ 12,5	caldo con hidrolisado de caseína + glucosa + pan- totonato Ca + biotina. pH 6,5 - inóculo e incubación: co- mo el anterior.
		3	≤ 50	
<u>Sacch. cerevisiae</u>	1		0,39	
<hr/>				
<u>Cr. neoformans</u>	6	3	≤ 100	caldo de carne con extrac- to de levadura (medio de Grave y Randall) inóculo e incubación: co- mo el anterior
		2	400	
		1	2.000	
<u>Sacch. cerevisiae</u>	1		100	
<hr/>				
<u>Cr. neoformans</u>	6	6	≤ 3,9	suero humano normal inóculo e incubación: co- mo el anterior
<hr/>				
(2) <u>T. glabrata</u>	35	32	≤ 0,2	medio base nitrogenado + l-asparagina + glucosa inóculo: cultivo de 24 hs diluido 10 ⁻³ incubación: 48hs a 37°C

(1) Shadomy, 1969⁵³

(2) Marks, Steer y Eickhoff, 1971³⁶

ESPECIES	Nº de CEPAS		Concentración inhibitoria 5 ⁻ FC (µg/ml)	METODO de DILUCION en tubo
	total	sensibles		
(3) <u>C. albicans</u>	20	8	≥ 62,5	medio base nitrogenado + L-asparagina + glucosa inóculo: cultivo de 24 hs diluido 10 ⁻³ incubación: 48 hs a 37°C
<u>T. glabrata</u>	36	9	≥ 62,5	
<hr/>				
(4) <u>C. albicans</u>	25	23	≤ 1,95	medio, inóculo e incuba- ción: como el anterior
<u>T. glabrata</u>	47	39	≤ 1,95	
<u>Candida spp.</u>	11	9	≤ 1,95	
<u>Cr. neoformans</u>	3	1	0,48	
		1	3,9	
		1	15	
<u>Aspergillus sp.</u>	7	3	≤ 3,9	
<hr/>				
(5) <u>C. tropicalis</u>	15	10	≤ 12,5	medio: como el anterior incubación: 24 hs a 30°C
<u>C. albicans</u>	57	33	≤ 12,5	
<u>C. parapsilosis</u>	13	4	≤ 12,5	
<hr/>				
<u>Candida spp.</u>	91	79	≤ 12,5	incubación: 24 hs a 30°C
		12	> 100	
<hr/>				
<u>Candida spp.</u>	91	52	≤ 12,5	incubación: 48 hs a 30°C
		37	> 100	
<hr/>				

(3) Marks y Eickhoff , 1971 ³⁵

(4) Steer , Marks , Klite y Eickhoff , 1972 ⁵⁸

(5) Shadomy , Kirchoff e Ingroff , 1973 ⁵⁵

ESPECIES	Nº de CEPAS total	sensibles	Concentración inhibitoria 5-FC (µg/ml)	METODO de DILUCION en tubo
(6) <u>C. albicans</u>	529	24	≥ 31	
<u>C. tropicalis</u>	54	3	≥ 31	
<u>T. glabrata</u>	153	1	≥ 31	
<hr/>				
(7) <u>Coccidioides immitis</u>			> 500	medio con glucosa, acetato de amonio y sales
<hr/>				
(8) <u>Histoplasma capsulatum</u>			100	medio de Sabouraud incubación: 5 días
<u>Blastomyces dermatitidis</u>			25	
<u>Coccidioides immitis</u>			100	
<u>Sporothrix sp.</u>			100	
<u>Histoplasma duboisii</u>			100	
<u>Cr. neoformans</u>			0,09	
<u>Cephalosporium spp.</u>			12,5 - 100	
<u>Leotrichum candidum</u>			6,25	
<u>Mucor corymbifera</u>			100	
<u>Absidia italiana</u>			100	
<u>Madurella mycetozii</u>			100	
<u>Phialophora verrucosa</u>			0,78 - 12,5	
<u>Phialophora pedrosoi</u>			3,12 - 25	
<u>Cladosporium carrionii</u>			6,25 - 25	
<u>Cladosporium trichoides</u>			3,12	
<u>Cladosporium werneckii</u>			100	

(6) Speller y Davies , 1973⁵⁶ (7) Lones , 1970³³ (8) Drouhet , 1973¹⁶

ESPECIES	N° de CEPAS		Concentración inhibitoria 5-80 (µg/ml)	MÉTODOS de DILUCION
	total	sensibles		
(8) <u>Aspergillus fumigatus</u>			6,25 - 100	<u>en tubo</u> medio de Sabouraud incubación: 48 hs
<u>Aspergillus nidulans</u>			12,5 - 100	
<u>Aspergillus flavus</u>			100	
<u>C. albicans</u>			0,09 - 3,12	medio de Sabouraud incubación: 24 hs
<u>C. tropicalis</u>			3,12 - 6,25	
<u>C. parapsilosis</u>			0,09 - 3,12	
(9) <u>C. albicans</u>	413	57	≤ 0,25	<u>en placa</u> medio de Wickerham inóculo: 0,02 ml de cultivo de 24hs incubación: 48 hs a 37°C
		175	≤ 1	
		57	≤ 5	
		18	≤ 50	
		36	> 100	
		36	> 100	
<u>T. labrata</u>	58	7	≤ 0,25	
		16	≤ 1	
		17	≤ 5	
		10	≥ 100	
		8	≤ 50	
<u>Candida spp.</u>	7	6	≤ 5	
		1	> 100	
<u>Geotrichum sp.</u>	1		0,25	

(8) Drouhet , 1973 ¹⁶

(9) Hamilton Miller , 1972 ²¹

ESPECIES	Nº de CEPAS		Concentración inhibitoria 5-FC (µg/ml)	METODO de DILUCION en placa
	total	sensibles		
(9) <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	4	3	≤ 5	medio de Wickerham inóculo: 0,02 ml de cultivo de 24 hs. incubación: 48 hs a 37°C
		1	> 100	
(10) <u>C. albicans</u>	135	124	≤ 25,6	medio de Wickerham inóculo: 0,05 ml de suspensión lig. turbia de cultivo de 48 hs incubación: 7 días a 37°C
		3	≤ 102	
		6	≤ 1.638	
<u>Candida</u> spp.	43	31	≤ 25,6	
		1	≤ 102	
		11	≤ 1.638	
<u>T. clabrata</u>	50	47	≤ 25,6	
		3	≤ 1.638	
(11) <u>C. albicans</u>	10	3	50	medio de Wickerham al $\frac{1}{2}$ inóculo: 5×10^7 blastos- poros incubación: 6 días a 37°C
		4	100	
		3	> 100	
<u>C. albicans</u>	10	1	500	medio e incubación: como el anterior inóculo: 5×10^6 blastos- poros
		9	> 500	

(9) Hamilton Miller, 1972²¹

(10) Schönebeck y Ansahn, 1973⁵²

(11) Davies y Savage, 1974¹³

ESPECIES	Nº de CEPAS		Concentración	METODO de DILUCION
	total	sensibles	inhibitoria	en placa
			5-FC ($\mu\text{g/ml}$)	
(11) <u>C. albicans</u>	10	8	50	agar con 50% de suero humano incubación: 6 días a 37°C inóculo: 5×10^5 blastosporos
		2	> 100	
<u>C. albicans</u>	10	3	50	medio e incubación: como el anterior inóculo: 5×10^6 blastosporos
		7	> 100	
<u>C. albicans</u>	10		> 100	medio e incubación: como el anterior inóculo: 5×10^8 blastosporos
<u>C. albicans</u>	10	6	500	agar con 50% de orina incubación: 6 días a 37°C inóculo: 5×10^5 blastosporos
		4	> 1.000	
<u>C. albicans</u>	10		> 1.000	medio e incubación: como el anterior inóculo: 5×10^6 blastosporos

Varios autores comprobaron la correlación entre los métodos de difusión y dilución (en tubo o placa), y recomendaron el uso de los discos con 5-FC en la práctica clínica.^{52,35,6}

Schönebeck y Ansón⁵² hallaron dos tipos de resistencia a la 5-FC. Las levaduras que presentan el tipo A no son afectadas por concentraciones de 1.638 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y dentro de los 3 días dan colonias de tamaño igual a las de la placa control. Las levaduras que tienen el tipo de resistencia B, con frecuencia, son inhibidas por concentraciones muy bajas de 5-FC, pero a los 7 días crecen en presencia de concentraciones varias veces mayores que las toleradas a los 3 días. Entre las especies de Candida predomina la resistencia del tipo B, mientras que la T. glabrata tiene sólo resistencia del tipo A.

Diversos investigadores observaron la aparición de resistencia a la 5-FC en las cepas de C. albicans y Cr. neoformans aisladas durante o después del tratamiento, lo que demuestra la necesidad de una prueba de sensibilidad previa a la terapia.^{7,13}

III.- MATERIALES

a.- Cepas de hongos patógenos

Las cepas de Paracoccidioides brasiliensis (5) e Histoplasma capsulatum (3) fueron provistas por la Profesora M. D. V. de Kolar, quien las había aislado de casos humanos.

La cepa de Coccidioides immitis provenía del cepario de la Cátedra de Micología Médica e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias (U. N. L. P.)

b.- Cepas de hongos endosaprófitos

Las levaduras fueron aisladas de 86 muestras de esputo, 14 de secreciones bronquiales y 4 de hisopado de fauces, en el Instituto Biológico de La Plata.

c.- 5-fluor-citosina

La droga fué provista por Productos Roche S.A.

IV.- METODOS

1.- AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS

Sembramos las muestras de esputo, aspiración bronquial, líquido de lavado bronquial o hisopado de fauces sobre el medio de Sabouraud, al que previamente agregamos 0,1 ml de una solución de kanamicina al 1% por tubo, y colocamos unos tubos a 28°C y otros a 37°C.

Sembramos por agotamiento todas las cepas obtenidas en el primocultivo, haciendo estrias sobre una placa del medio de Sabouraud, y las incuba-

nos a 28°C durante 1 a 3 días. Repicamos sobre el medio de Sabouraud todas las colonias que difieran en su morfología macro y microscópica.

2.- IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

A.- Estudio de las características morfológicas.

a.- Formación de tubos germinativos: Suspendimos el contenido de un ana cargada con un cultivo de 2 días sobre el medio líquido de Sabouraud, en 1 ml de caldo - suero y lo dejamos a 37°C durante 3 hs.¹

b.- Producción de clamidosporos: Empleamos un medio que contenía almidón (2%), tioglicolato de sodio (0,01%), tween 80 (1%), agar (1,5%) y tierra de jardín (0,2%). Dejamos las placas a 28°C durante 20 a 24 hs para secar la superficie. Sembramos las cepas haciendo una estria profunda y las colocamos a 28°C durante 2 a 7 días.⁵

c.- Desarrollo del pseudomicelio: Cultivamos las cepas sobre un medio que contenía fécula de papas (2%), glucosa (1%) y agar (1,5%), y las incubamos a 28°C durante 2 a 7 días.

d.- Formación de ascosporas: Sembramos las cepas sobre el medio que contenía glucosa (0,1%), neopeptona (1%), cloruro de sodio (0,1%), agar (1,5%) o sobre los cubos de yeso húmedos, y los incubamos a 28°C durante 7 a 28 días.³²

B.- Estudio de las características fisiológicas

a.- Pruebas de fermentación: Preparamos los tubos con 9,5 ml del medio que contenía bactopectona (0,5%), extracto de levadura (0,5%) y un tubo de Durham. Agregamos 0,5 ml de la solución al 20% del glúcido (glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa) esterilizada por tindalización. Sembramos una o dos gotas de una suspensión ligeramente turbia del cultivo en medio de Sabouraud y los colocamos a 37°C durante 7 a 15 días.⁵⁹

b.- Pruebas de asimilación: Preparamos placas con el medio base nitrogenado que contenía sulfato de amonio (0,5%), fosfato monopotásico (0,1%) sulfato de magnesio (0,05%), agar (2%), inoculadas con una suspensión de la cepa en estudio. Depositamos en la superficie del medio una pequeña cantidad de los glúcidos en los distintos sectores y colocamos las placas a 28°C durante 7 días. En algunos casos agregamos a cada placa 1 gota de solución de extracto de levadura al 1%. También preparamos el medio base nitrogenado líquido con 5% del glúcido elegido.

Para la prueba de asimilación del nitrato utilizamos tubos con el medio que contenía glucosa (2%), fosfato monopotásico (0,1%), sulfato de magnesio (0,05%), y nitrato de potasio (1%).³²

c.- Prueba de la ureasa: Empleamos un medio base que contenía peptona (0,1%), glucosa (0,1%), cloruro de sodio (0,5%), fosfato monopotásico (0,3%), fosfato bipotásico (0,3%), rojo de fenol (0,001%), agar (2,5%), al que agregamos 0,5 ml por tubo de una solución de urea al 40%.¹

1.- ENSAYOS CON 5-FLUOR-CITOSINA

a.- Repitues

Antes de los ensayos, replicamos las cepas de levaduras en un medio líquido con neopeptona (2%) y glucosa (1%) de pH aprox. 6,5 y las colocamos a 28°C durante 48 hs. Cultivamos las cepas de Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis y Coccidioides immitis en el medio líquido a 28°C durante 14 a 28 días. También replicamos las cepas de P. brasiliensis sobre un medio nutritivo con suero para obtener la forma levadura.

b.- Prueba en medio líquido

Sembramos unos 80.000 a 150.000 elementos del cultivo de la levadura, con un asa de 4 mm de diámetro, en 10 ml de medio líquido al que habia-

mos agregado la 5-fluorocitosina y lo incubamos a 28°C durante 7 días. También cultivamos, en iguales condiciones, unos 200 a 500 elementos en suspensión del hongo patógeno,

c.- Prueba en medio enriquecido

Preparamos una suspensión de la levadura con un asa del cultivo en 10 ml de agua y depositamos 0,05 ml en las placas del medio sin y con 0,25 mg de 5-fluor-citosina por ml, a las que incubamos durante 7 a 21 días, a 28°C. En iguales condiciones, sembramos un asa de la suspensión del hongo patógeno.

d.- Prueba en el medio con sangre

Hicimos los cultivos en las mismas condiciones que el ensayo anterior, pero sobre el medio de Sabouraud con un 10% de sangre defibrinada de bovino, contenido en tubos.

e.- Prueba en el medio de Smith

Sembramos las cepas en las mismas condiciones que en el ensayo d.

f.- Prueba con el método de difusión

Sembramos un asa del cultivo de la levadura en el medio que contiene sulfato de amonio (0,5%), fosfato monopotásico (0,1%), sulfato de magnesio (0,05%), glucosa (1%), extracto de levadura (0,01%), agar (2%), y depositamos sobre la placa unos discos de papel de filtro de 12,7 mm de diámetro con una cantidad determinada de 5-fluor-citosina. Luego de una incubación de 2 días a 28°C medimos el diámetro de los halos de inhibición.

g.- Prueba de aislamiento

Sembramos unas 400 a 750 células de la levadura y unos 20 a 50 elementos del hongo patógeno en las placas del medio sin y con 0,25 mg de 5-fluor-citosina por ml e incubamos a 28°C durante 21 a 28 días.

4.- AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATÓGENOS PRESENTES EN MATERIALES CLINICOS.

Sembramos las muestras de esputo sobre el medio de Sabouraud, al que previamente agregamos 0,1 ml de una solución de kanamicina al 1% y 1 ml de una solución de 5-fluor-citosina al 0,25 % por tubo. Colocamos unos tubos a 28°C y otros a 37°C, durante 21 a 28 días. Repicamos sobre el mismo medio las colonias sospechosas e incubamos a 28°C durante 14 a 21 días.

V.- RESULTADOS

1.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS

Aislamos, en un lapso de dos años, 114 cepas de hongos endocáprifos a partir de 104 muestras clínicas.

<u>Materiales</u>	<u>Nº de muestras</u>	<u>Nº de cepas</u>
esputo	86	94
secreción bronquial	14	16
hisopado de fauces	4	4
<u>Totales</u>	<u>104</u>	<u>114</u>

Identificamos las levaduras por su morfología y características bioquímicas, como describen Lodder- Kreger van Rij (1952)³² y Ahearn (1974).¹

En el cuadro siguiente damos la frecuencia del aislamiento de las diferentes especies de levaduras a partir de los materiales clínicos. (pag. 26)

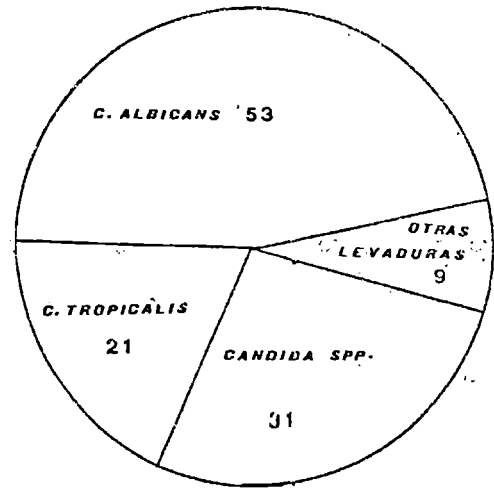
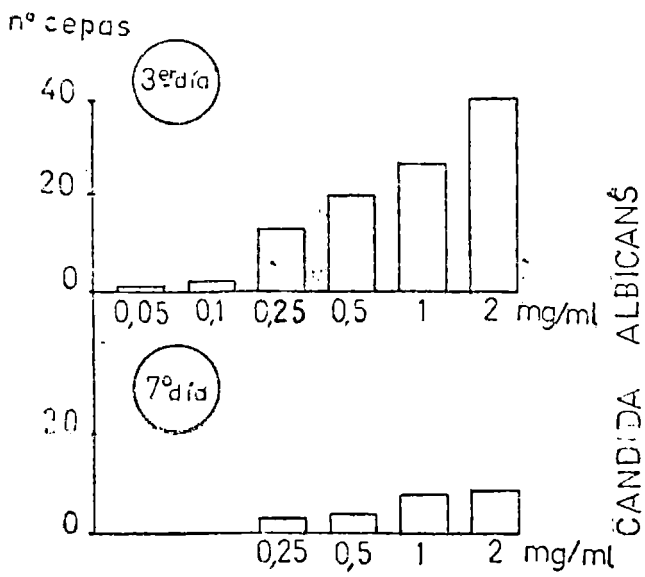
ESPECIES	FUENTES DE AISLAMIENTO			TOTALES
	esputo	secreción bronquial	hisopado de fauces	
<u>Candida albicans</u>	48	5	-	53 (46,5 %)
<u>C. glaucozyma</u>	9	-	1	10 (8,77 %)
<u>C. guilliermondii</u>	2	-	-	2 (1,75 %)
<u>C. krusei</u>	2	-	-	2 (1,75 %)
<u>C. lusitana</u>	2	-	-	2 (1,75 %)
<u>C. parapsilosis</u>	4	2	-	6 (5,26 %)
<u>C. pseudotropicalis</u>	1	-	-	1 (0,88 %)
<u>C. species</u>	2	-	-	2 (1,75 %)
<u>C. stellatoidea</u>	5	-	1	6 (5,26 %)
<u>C. tropicalis</u>	15	4	2	21 (18,4 %)
<u>Geotrichum candidum</u>	-	1	-	1 (0,88 %)
<u>Kluyveromyces fragilis</u>	1	-	-	1 (0,88 %)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	2	-	-	2 (1,75 %)
<u>Torulopsis colliculosa</u>	"	1	-	1 (0,88 %)
<u>Trichosporon cutaneum</u>	1	1	-	2 (1,75 %)
<u>T. fermentans</u>	-	1	-	1 (0,88 %)
<u>T. infestans</u>	-	1	-	1 (0,88 %)
TOTALES	94(82,5%)	16(14,0%)	4(3,5%)	114 (100 %)

2.- ACCION DE LA 5-FLUOR-CITOSINA

A continuación damos los resultados de la acción de la 5-fluor-citosina sobre las levaduras endosaprófitas, en medio líquido.

DESARROLLO EN MEDIO LIQUIDO														
(neopeptona 1%, glucosa 1%, pH 6,5) incubado a 28°C durante 3 y 7 días.														
cepa n°	Concentración de 5-FC (µg/ml)													
	1	50	100	250	500	1000	2000	10	50	100	250	500	1000	2000
8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
54	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
57	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
59	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
62	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

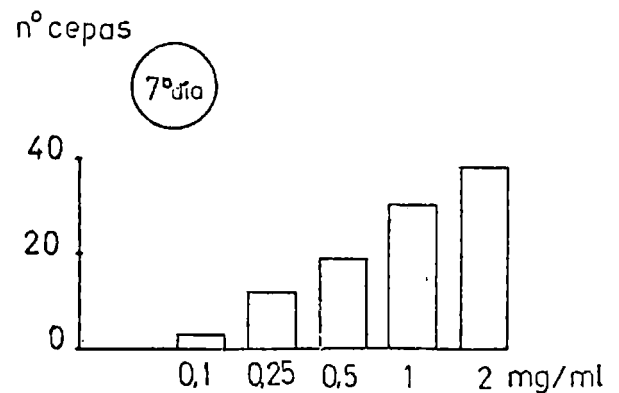
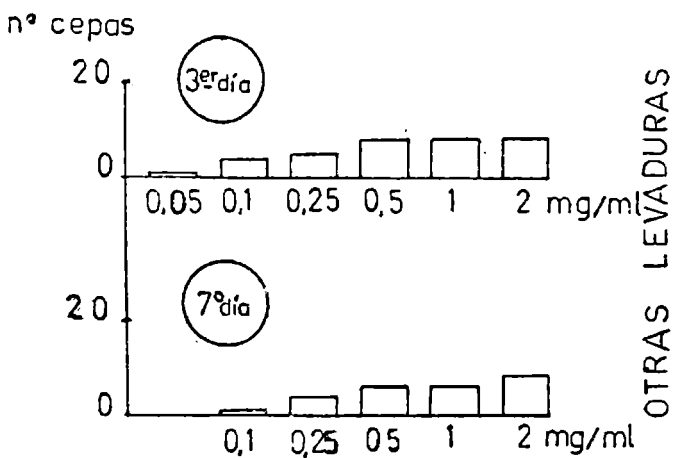
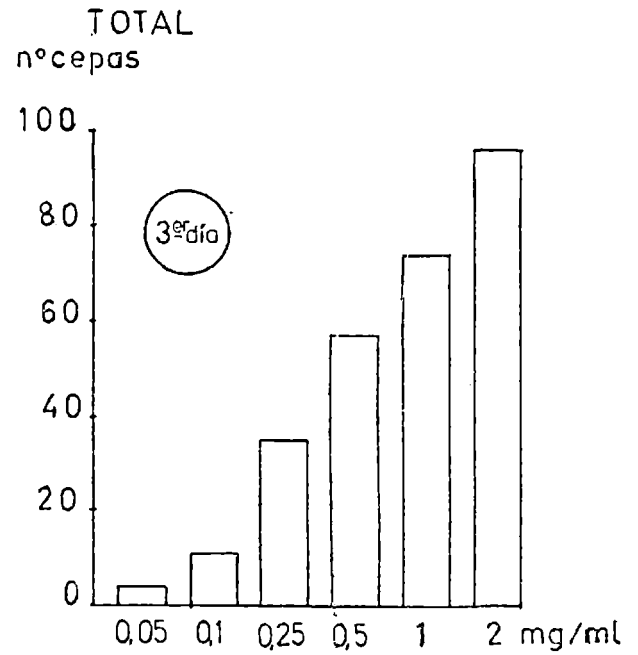
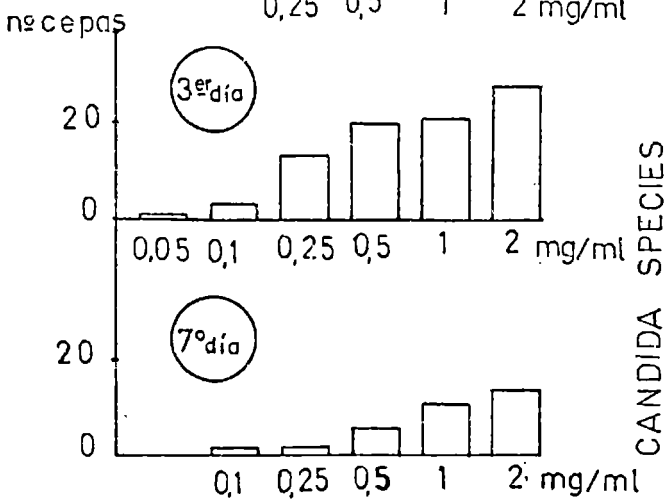
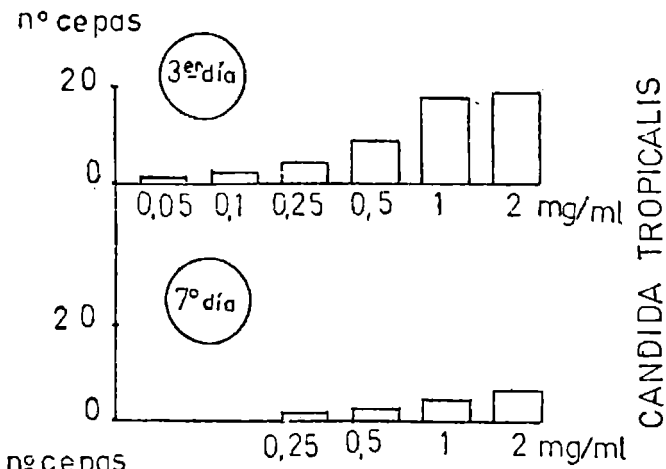
Los gráficos y el cuadro de la página 30 representan el número acumulativo de cepas sensibles luego de 3 y 7 días de incubación durante la prueba de la acción de la 5-fluor-citosina sobre las levaduras, en medio miquido.



N° CEPAS AISLADAS DE ESPUTO Y OTROS MATERIALES

*

LEVADURAS SENSIBLES A LA 5-FC



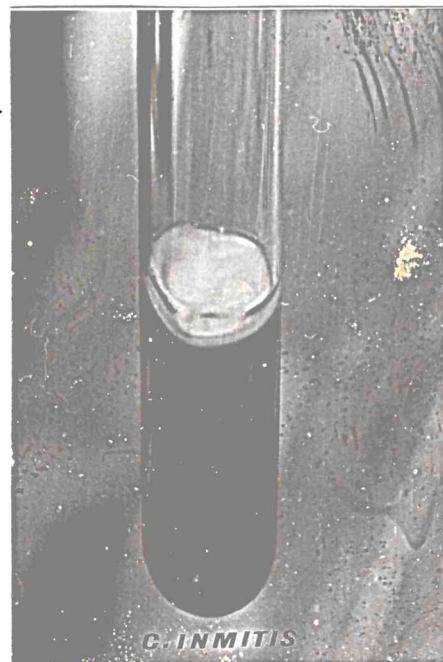
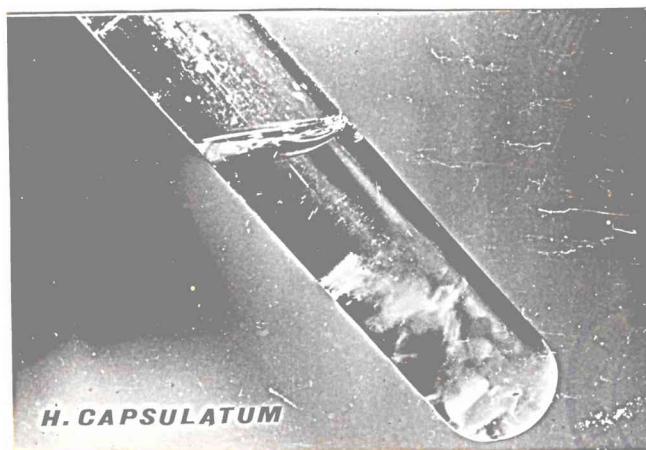
SENSIBILIDAD DE LAS LEVADURAS A LA 5-FLUOR-CITOSINA

en medio líquido (neopeptona 1%, glucosa 1%, pH 6,5) luego de 3 y 7 días a 28°C

N° de cepas	Especies	concentración mg 5-FC / ml							
		0,01	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	2,0	
(53)	<u>C. albicans</u>	- -	1 -	2 -	13 3	20 4	27 8	41 9	
(10)	<u>C. claussenii</u>	- -	- -	- -	2 -	5 1	6 1	8 3	
(2)	<u>C. guilliermondii</u>	- -	- -	- -	1 -	1 -	1 -	1 -	
(2)	<u>C. krusei</u>	- -	- -	1 1	2 2	2 2	2 2	2 2	
(2)	<u>C. lusitana</u>	- -	- -	- -	1 -	2 1	2 1	2 1	
(6)	<u>C. parapsilosis</u>	- -	- -	1 -	2 -	3 -	3 1	6 2	
(1)	<u>C. pseudotropicalis</u>	- -	1 -	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	
(2)	<u>C. species</u>	- -	- -	- -	1 -	2 1	2 2	2 2	
(6)	<u>C. stellatoidea</u>	- -	- -	- -	3 -	4 -	4 3	6 3	
(21)	<u>C. tropicalis</u>	- -	1 -	2 -	4 2	9 3	18 5	19 7	
(1)	<u>C. candidum</u>	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	
(1)	<u>K. spiculata</u>	- -	- -	1 -	1 1	1 1	1 1	1 1	
(2)	<u>S. cerevisiae</u>	- -	- -	1 1	2 1	2 2	2 2	2 2	
(1)	<u>T. colliculosa</u>	- -	- -	1 -	1 1	1 1	1 1	1 1	
(2)	<u>Tr. cutaneum</u>	- -	1 -	1 -	1 1	2 2	2 2	2 2	
(1)	<u>Tr. formentana</u>	- -	- -	- -	- -	1 -	1 -	1 1	
(1)	<u>Tr. infestans</u>	- -	- -	- -	- -	1 -	1 -	1 1	
(114)	Totales	- -	4 -	11 3	35 12	57 19	74 30	96 38	

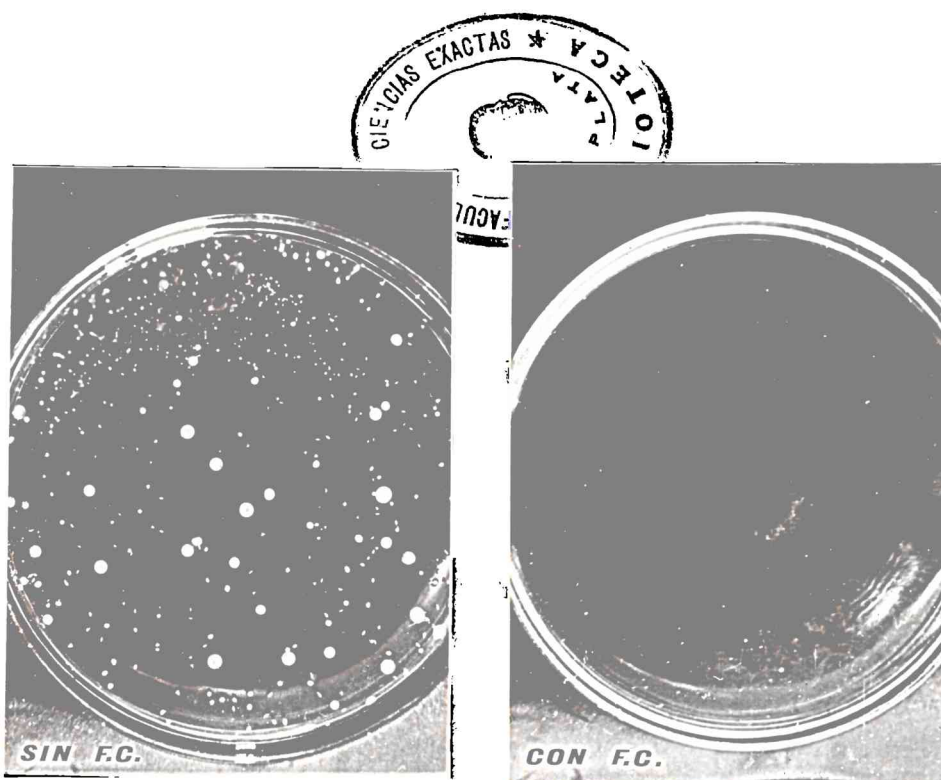
Todas las cepas de hongos patógenos sembradas en el medio líquido (neopeptona 1%, glucosa 1%, pH 6,5) fueron resistentes a 1 mg 5-FG / ml sin presentar alteraciones morfológicas.

Las fotografías muestran el desarrollo de Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum y Paracoccidioides brasiliensis, a los 28, 21 y 28 días respectivamente.



Presentamos en el cuadro de la página 33 los resultados del ensayo sobre el medio gelificado (neopeptona 1%, glucosa 1%, agar 1,5%, pH 6,5) después de 7 días a 28°C, como el % de colonias potenciales inhibidas calculado a partir de la diferencia del número de colonias sobre las placas sin y con 250 µg 5-FC / ml.

Las fotografías muestran el desarrollo de una cepa de Candida albicans sobre el medio sin y con 250 µg 5-FC / ml, a las 48 horas.



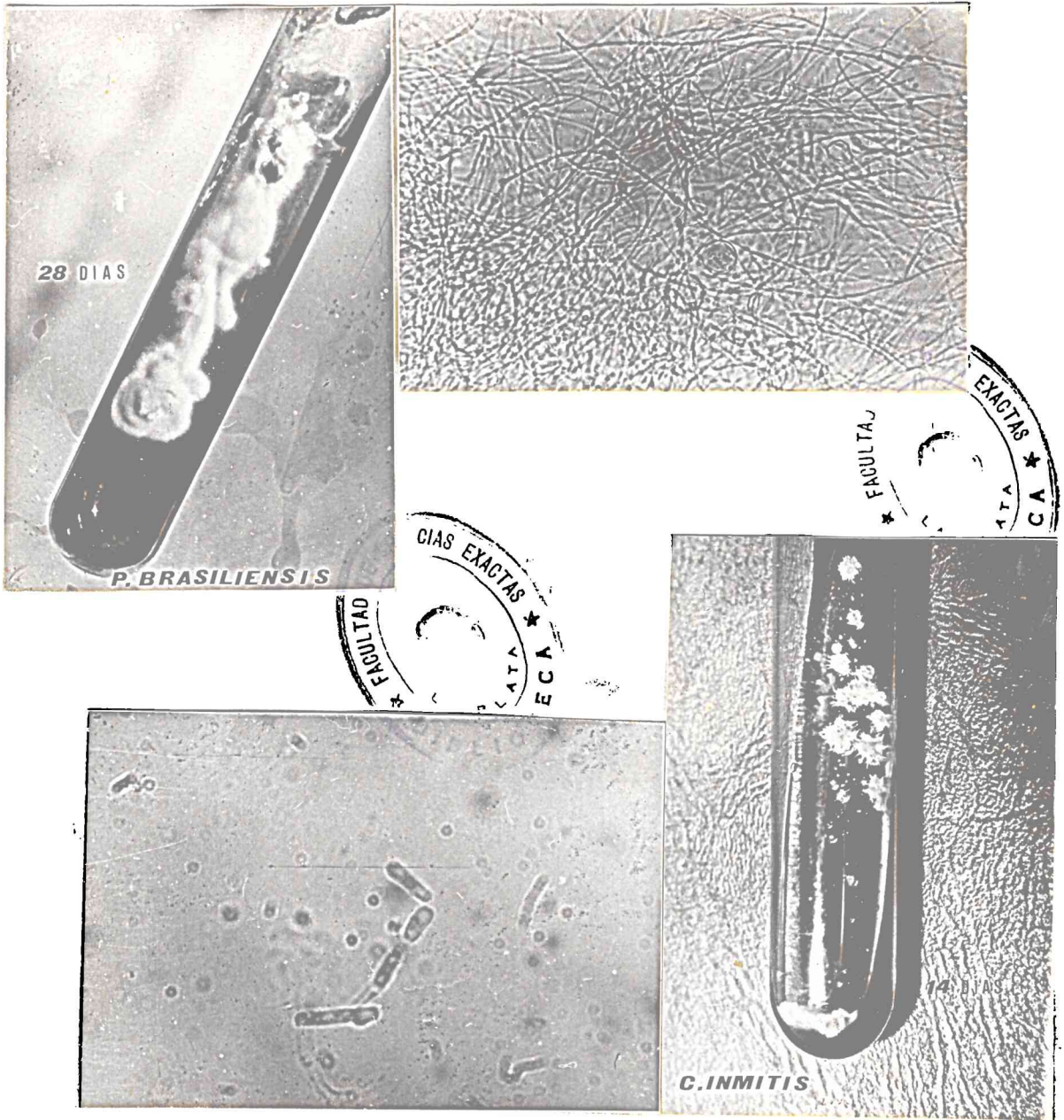
A los 21 días las colonias de ambas placas tenían el mismo tamaño pero no varió el número de las mismas.

También expresamos en el cuadro siguiente los resultados del método de difusión en medio base nitrogenado con glucosa 1%, luego de 48 hs a 28°C.

Cepa N°	Especies	diámetro (mm) halo de inhibición disco 12,7 mm - 48 hs a 28°C +5-FC				% colonias potenciales inhibidas 7 días a 28°C 250 µg/ml 5-FC
		0,5 µg	2 µg	5 µg	10 µg	
4	<u>Candida parapsilosis</u>	26	33	42	51 mm	61,0 %
13	<u>Candida albicans</u>	30	35	43	54 "	75,4 "
19	<u>Candida stellatoidea</u>	30	45	52	"	85,2 "
28	<u>Candida albicans</u>	35	46	51	"	86,0 "
59	<u>Candida claussenii</u>	20	27	35	44 "	57,6 "
61	<u>Candida albicans</u>	31	42	45	53 "	75,6 "
62	<u>Candida tropicalis</u>	25	29	34	40 "	57,7 "
80	<u>Candida krusei</u>	30	40	49	"	100 "
90	<u>Candida albicans</u>	25	35	40	"	53,6 "
104	<u>Trichosporon</u> <u>infestans</u>	13	19	27	32 "	41,5 "

En el medio de Smith, con 250 µg 5-FC /ml, las³ cepas de Candida spp. probadas desarrollaron con dificultad y observamos que el % de colonias potenciales inhibidas era 97, 99 y 100 %.

Las cepas de hongos patógenos sembradas en el medio gelificado con 250 µg 5-FC /ml tenían el aspecto macro y microscópico típicos. Las fotografías muestran el desarrollo de Coccidioides immitis y Braccocidioides brasiliensis, a los ¹⁴ 28 días.



La presencia de sangre no modificó la acción de la 5-fluor-citocina sobre las levaduras endosaprófitas ya observada en el medio de Sabouraud. Las características de los hongos patógenos sembrados en el medio de Sabouraud con sangre y $250 \mu\text{s}$ 5-FC / ml eran las habituales.

En las placas del medio gelificado con 250 μ g 5-FU / ml sembrados con Paracoccidioides brasiliensis y algunas cepas de Candida albicans que resultaron resistentes en la prueba en medio líquido, observamos la primarífa del desarrollo de los patógenos. Igual resultado fué obtenido con los esputos contaminados experimentalmente con cepas del patógeno arriba nombrado.

Logramos aislar Histoplasma capsulatum del esputo de un paciente con histoplasmosis, que contenía numerosas células de Candida sp., sembrando la muestra sobre el medio de Sabouraud con 250 μ g de 5-fluorocitosina y 100 μ g de kanamicina por ml. Luego de 4 semanas de incubación a 28°C, repicamos una de las colonias sospechosas sobre el mismo medio y obtuvimos el cultivo puro. Las fotografías muestran el primocultivo, el repique y el aspecto microscópico de la cepa aislada.





Finalmente, debemos indicar que encontramos colonias de Cladosporium sp., Sclerulariopsis sp., Sarcina sp. y Bacillus sp. contaminando accidentalmente las placas de medio con 5-fluor-citosina.

VI.- CONCLUSIONES

Aislamos un total de 114 cepas a partir de las muestras de esputo, secreciones bronquiales e hisopado de fauces, de las cuales 53 (46,5 %) eran Candida albicans; 52 (45,6 %) correspondían a otras especies de Candida y 9 (7,9 %) eran otras levaduras.

Para los ensayos con la 5-fluor-citosina elegimos el medio de cultivo con neopeptona 1 % y glucosa 1 % (pH 6,5) pues no afecta la velocidad de crecimiento de los hongos patógenos. En este medio, después de 3 días de incubación a 28°C, 51 % de las cepas de C. albicans y 77 % de las otras levaduras eran sensibles a 1 mg de 5-fluor-citosina por ml; mientras que a los 7 días sólo lo eran 15 % y 36 % respectivamente. Todas las cepas de Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum y Paracoccidioides brasiliensis eran resistentes a esa concentración, sin presentar alteraciones morfológicas.

Observamos que sobre el medio anterior gelificado y con 0,25 mg de 5-fluor-citosina por ml, eran inhibidas entre el 50 y 100 % de las colonias potenciales de varias cepas de Candida spp. Las cepas de hongos patógenos, sobre el mismo substrato, tenían el aspecto macro y microscópico típicos y no hubo una modificación apreciable del número de colonias.

Hemos confirmado la posibilidad del empleo de la 5-fluor-citosina para el aislamiento de hongos patógenos, en presencia de levaduras endosporófitas, trabajando con esputos de un paciente con histoplasmosis pulmonar y materiales experimentalmente contaminados con Paracoccidioides brasiliensis, a partir de los cuales obtuvimos los cultivos del agente causal^o y las cepas agregadas, respectivamente.

o) Histoplasma capsulatum

VII.- BIBLIOGRAFIA

1.- AHEARN, D. J.- 1974 - (Identificación y ecología de las levaduras de importancia médica) in: PRIER, J. E. & FRIEDMAN, H.- "Opportunistic pathogens" University Park Press, Baltimore.

2.- ALTERAS, I. y TÁTARU, V.- 1969 - (Resultados micológicos de 150 productos de aspiración bronquial tomados en medio hospitalario) Mycosen 12 : 695 - 697 (RMVM 1970 - 1 n° 365)

3.- ARELLANO OCAMPO, F.- 1972 - "Estudio epidemiológico de la cromomycosis en México"- Medicina Cutánea 6: 309 - 319 (RMVM 1974 - 2 n° 312)

4.- ATKINSON, J. W. e ISRAEL, H. L.- 1973 - (Tratamiento de la aspergilosis meníngea y pulmonar con 5-fluorocitosina) American Journal of Medicine 55: 496 - 504 (RMVM 1974 - 2 n° 1393)

5.- BADE, G. H.- 1974 - Comunicación personal.

6.- BLAKER, R. O. y DOUTT, B. J.- 1972 - (Práctico ensayo cuantitativo para 5-fluorocitosina en suero y otros líquidos biológicos) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 2: 502 - 503 (RMVM 1973 - 8 n° 1015)

7.- BLOCK, E. R.; JENNINGS, A. E. y BENNETT, J. E.- 1973 - (Variables que influyen sobre el ensayo de sensibilidad a la 5-fluorocitosina en el Cryptococcus neoformans) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 4: 392 - 395 (RMVM 1974 - 9 n° 905)

8.- BONFIGLIOLI, H. y LONGOBARDI, L. A.- 1956 - Orientación Médica 5: 1083.

9.- BLAKER, R. O. y DOUTT, B. J.- 1973 - (Ensayo de dos antimicrobianos) American Review of Respiratory Diseases 107: 303 - 309 (RMVM 1974 - 2 n° 1257)

10.- LUDTZ - JØRRIENSEN, A.- 1972 - (Estomatitis dental V : Aglutininas de Candida en suero humano) Acta Odontologica Scandinavica 10 : 313 - 325 (BMVM 1974 - 2 n° 399)

11.- CONTI DIAZ, I. A.- 1971 - (Células gigantes de Histoplasma capsulatum en esputo de pacientes con histoplasmosis pulmonar) Sabouraudia 9: 239 - 244 .

12.- DAVIES, R. R. y REEVES, D. S.- 1971 - (Candidiasis urinaria y 5-fluorocitosina) British Medical Journal (1): 577 - 579 (BMVM 1972 - 7 n°4361)

13.- DAVIES, R. R. y SAVAGE, M. A.- 1974 - (Observaciones sobre la 5-fluorocitosina y Candida albicans) Sabouraudia 12 : 302 - 308 .

14.- DROCHOWSKA, H. y BULUK, H.- 1971 - (Incidencia de Candida spp. en la cavidad oral de escolares urbanos y rurales) Czas. Stomat. 24: 859 - 864 (BMVM 1972 - 7 n°3456)

15.- DOLAN, C. T.- 1971 - (Concentración y combinación óptimas de antibióticos en los medios para el aislamiento de los hongos patógenos y Nocardia asteroides) Applied Microbiology 21 : 195 - 197

16.- DROUHET, E.- 1973 - (Micosis profundas viscerales: un problema actual de diagnóstico y terapéutica) Revue des progrès thérapeutiques 42 : 1244 .

17.- DROUHET, E.- 1975 - "Algunos aspectos actuales de las micosis infantiles profundas, viscerales, por hongos oportunistas".- Anales Nestlé 122: 3 - 40 .

18.- DUFRESNE, J. J.- 1972 - (El tratamiento de la meningo-encefalitis criptocócica. Interés de la 5-fluorocitosina) Revue Médicale de la Suisse Romande 92 : 597 - 614 (BMVM 1974 - 2 n° 1508)

19.- FRIEDRICH, E. y BÖHME, H.- 1974 - (El crecimiento de las levaduras sobre los medios conteniendo cicloheximida) Nykosen 17: 191 - 198

(RMM 1975 - 10 n° 532)

20.- J. HARRISON, R. J. y GORDON, L.- 1971 - (Un método de cultivo y concentración para mejorar el aislamiento del Histoplasma capsulatum de esputo) Health Laboratory Science 8 : 231 - 237 .

21.- HAMILTON-MILLER, J. M. T.- 1972 - (Un estudio in vitro comparativo de la acción de anfotericina B, clotrimazol y 5-fluorocitosina sobre levaduras aisladas clínicamente) Sabouraudia 10 : 276 - 283 .

22.- HOLT, R. J. y NEWMAN, R. L.- 1973 - (La actividad antimicótica de la 5-fluorocitosina) Journal of Clinical Pathology 26 : 167 - 174 (RMM 1974 2 n° 590)

23.- ISACSON, M.; NOAH, Z.; FABER, J.; HERISHANO, Y. y GOTTFRIED, L.- (Uso de la 5-fluorocitosina en candidiasis sistémica infantil) Archives of Disease in Childhood 47 : 954 - 959 (RMM 1974 - 2 n° 1456)

24.- JEN, T. M.; SHERR, S. L. y KOO, S. J.- 1967 - (Estudio sobre Candida spp. aisladas de esputo de casos crónicos de enfermedades pulmonares en China) Journal of Formosan Medical Association 66 : 187 - 192 (RMM 1971 - 7 n° 1720)

25.- JUND, R. y LACROUTE, F.- 1970 - (Aspectos genéticos y fisiológicos de la resistencia a la 5-fluorocitosina en Saccharomyces cerevisiae) Journal of Bacteriology 102 : 607 - 615.

26.- KATAN, B. M.- 1974 - "Antimicrobial therapy" 2° ed. - W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

27.- KAPICA, L.; SHAW, C. E. y BARTLETT, J. W.- 1963 - (Inhibición del Histoplasma capsulatum por Candida albicans y otras levaduras sobre medio agar de Sabouraud) Journal of Bacteriology 95 : 2171 - 2176

28.- KOHLSCHUTTER, A. y PELET, B.- 1974 - (Candidiasis pulmonar tratada con 5-fluorocitosina) Archives of Disease in Childhood 49 : 154 - 156 (RIVM 1975 - 10 n° 199)

29.- KOLAR, M. B. V. de - 1958 - "Frecuencia de Candida albicans en secreciones bronquiales"- Tesis, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

30.- KREMER-VAN RIJ, N. J. W.- 1969 - (Taxonomía y sistematización de las levaduras) in: ROSE, A. H. y HARRISON, J. S. "The yeasts" vol. 1, Academic Press, London.

31.- KUHNATOWSKA, A.; ZABINSKA, O. y WARA-WASOWSKA, K.- 1969 - (Especies de hongos presentes en la cavidad oral) Czas. Stomat. 22 : 1141 - 1145 (RIVM 1970 - 7 n° 772)

32.- LODDER, J. y KREMER-VAN RIJ, N. J. W.- 1952 - "The yeasts" North Holland Publishing Co., Amsterdam.

33.- LOHES, O. W.- 1970 - (5-fluorocitosina en coccidioidomicosis experimental) American Review of Respiratory Diseases 102 : 128 - (RIVM 1971 - 7 n° 1393)

34.- LUCIEN, P.; BEAU, G. y QUIRON, M.- 1971 - (las candidiasis en los tuberculosos pulmonares . Frecuencias e incidencias digestivas) Revue de Tuberculose et Pneumologie 35 : 729 - 732 (1973 RIVM - 8 n° 517)

35.- MARKS, M. I. y EICKHOFF, T. C.- 1971 - (Aplicación de 4 métodos al estudio de la sensibilidad de las levaduras a la 5-fluorocitosina) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 1970 : 491 - 493 (RIVM 1972-7 n° 3245f)

36.- MARKS, M. I.; BTEER, R. & EICKHOFF, T. C.- 1971 - (Sensibilidad in vitro de Toxulopsis labrata a anfotericina B, 5-fluorocitosina y clotrimazol (BAY 5097)) Applied Microbiology 22 : 93 - 95 .

37.- MONTROCHER, R.- 1967 - (Las Candida spp. con poder fermentador y que no asimilan los nitratos) Bulletin Trimestral de la Societé de Mycologie France 83 : 641 - 730 .

38.- MORISON, N.L.; CONNOR, B. y GLAYTON, I.- 1974 - (Tratamiento exitoso de la oncomicosis con 5-fluorocitosina) British Journal of Dermatology 90 : 445 - 447 (REVISTA 1975 - 10 n° 152)

39.- NEJRONI, P.- 1960 - "Micosis profundas: volumen II, Histoplasmosis"- Comisión de Investigación Científica, La Plata.

41.- ESANZUKUHIRE, H.; VOLLUM, D. y POLTERA, A.A.- 1974 - (Oncomicosis debida a Cladosporium trichoides tratada con 5-fluorocitosina. Informe de un caso) American Journal of Clinical Pathology 61 : 257 - 263 (REVISTA 1974 - 2 n° 1527)

40.- NEJRONI, P.- 1966 - "Micosis profundas : volumen III, las blastomicosis y coccidioidomicosis"- Comisión de Investigación Científica, La Plata .

42.- ONIECZNYSKI, D.T.; SWATEK, P.E. y BECKER, S.W.- 1965 - (Un método rápido para el aislamiento del Coccidioides immitis de esputo) Health & Laboratory Science 2 : 35 - 39 .

43.- PANKEY, G.A. y DALOVISO, J.R.- 1973 - (Funguemia causada por Torulopsis glabrata) Medicina 52 : 395 - 403 (REVISTA 1974 - 2 n° 1516)

44.- POLAK, A.- 1974 - (Efectos de la 5-fluocitosina sobre la síntesis de proteínas y los aminoácidos totales en Candida albicans) Sabouraudia 12 : 309 - 319.

45.- PRADINAUD, R.- 1974 - (Tratamiento de 6 oncomicosis por la 5-fluorocitosina en la Guayana francesa) La Nouvelle Presse Médicale 3 : 1955 .

46.- REEP, B. R. y KAPLAN, W.- 1972 - (El uso de N-acetil-L-cisteína y ditiotreitol para procesar los esputos durante los exámenes micológicos y de anticuerpos fluorescentes) Health Laboratory Science 2 : 118 - 124 (RMVM 1974 - 2 n° 1238)

47.- REICHELDERFER, T. E.; PRAJA, J. R. y MIRZA, A. M.- 1972 - (Terapia con 5-fluorocitosina en criptococosis. Informe de un caso) Medical Annals of the District of Columbia 41 : 622 - 624 (RMVM 1974 - 2 n° 134)

48.- RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. y QUINTERO, M.- 1969 - (Efectos del pH y temperatura sobre el crecimiento del Paracoccidioides brasiliensis en extractos de suelo) Sabouraudia 7 : 207 - 215 (RMVM 1970 - 1 n° 211)

49.- RESTREPO, M. A. y CORREA, R. I.- 1972 - (Comparación de dos medios de cultivo para el aislamiento primario del Paracoccidioides brasiliensis de esputo) Sabouraudia 10 : 260 - 265 .

50.- SALKIN, I. F. y BURD, N.- 1972 - (Evaluación cuantitativa de las propiedades antifúngicas de la cicloheximida) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 1 : 177 - 184. (RMVM 1973 - 2 n° 377)

51.- SCHÖNEBECK, J.; STEN, L. y TÄRNVIK, A.- 1972 - (Tratamiento con 5-fluorocitosina de las infecciones a Candida del tracto urinario y otros sitios) Scandinavian Journal of Urology & Nephrology 6 : 37 - 43 (RMVM 1974 - 2 n° 389)

52.- SCHÖNEBECK, J. y ANSEIN, S.- 1973 - (Resistencia a la 5-fluorocitosina en Candida spp. y Torulopsis glabrata) Sabouraudia 11 : 10 - 20 .

53.- SHADOMY, S.- 1969 - (Estudios in vitro con 5-fluorocitosina) Applied Microbiology 17 : 871 - 877.

54.- SHADOMY, S.- 1970 - (Estudios in vitro con 5-fluorocitosina)

Infection & Immunity 2 : 484 - 488 (BMVN 1971 - 7 n° 2365)

55.- SHADOMY, D.; KIRCHOFF, C.B. e INIROFF, A.E.- (Actividad in vitro de la 5-fluorocitosina contra especies de Candida y Toralopsis) Antimicrobial Agents & Chemotherapy 3 : 9 - 14 (BMVN 1974 - 2 n° 390)

57.- SPELLER, D.C.E.- 1974 - (Infección del tracto urinario a Toralopsis glabrata tratada con 5-fluorocitosina) Journal of Clinical Pathology 27 : 50 - 52 (BMVN 1974 - 2 n° 1518)

56.- SPELLER, D.C.E. y DAVIES, W.D.- 1973 - (Sensibilidad de las levaduras a la 5-fluorocitosina) Journal of Medical Microbiology 6 : 315 - 321 (BMVN 1974 - 2 n° 1460)

58.- STEER, P.L. ; MARKS, H.I. ; KLITE, P.D. y BICKHOFF, T.C.- (5-fluorocitosina, un compuesto antifúngico oral. Informe de la experiencia clínica y de laboratorio) Annals of Internal Medicine 76 : 15 - 22 (BMVN 1973 - 8 n° 388)

59.- VANDREUSEHEM, R.- 1966 - "Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire " Masson et cie., Paris.

R. Davillo

