

## TIPIFICACION DE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS POR EL METODO DE TOXINAS KILLER

Luis Zaror<sup>1</sup> y M. P. Valdevenito<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Microbiología Clínica,  
<sup>2</sup> Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina,  
Universidad Austral de Chile,  
Casilla 567. Valdivia-Chile.

Palabras clave: *Candida albicans*, toxinas killer, tipificación

Key words: *Candida albicans*, Killer toxin, typification

### RESUMEN.

En los últimos años se ha reconocido la importancia y la relevancia clínica de levaduras aisladas de muestras de pacientes. *Candida albicans* es la especie mayoritariamente responsable de candidosis, de tipo oportunista. El aumento de infecciones por *Candida* ha llevado a desarrollar métodos de marcaje epidemiológico para encontrar los tipos más frecuentes. Se estudiaron 161 cepas de *C. albicans* aisladas de diferentes orígenes anatómicos, aplicando el método de tipificación por toxinas killer de Polonelli et al. (1983), encontrándose 48 tipos killer.

Los más frecuentes fueron el 812, 111, 811 y 712. No hubo una asociación particular entre el tipo killer hallado y la región anatómica del cual proviene la muestra, según cuadro clínico.

Sin embargo, epidemiológicamente, en un caso de corioamnionitis y de fungemia fué posible establecer que las cepas aisladas en el primero de líquido amniótico y raspado uterino y en el segundo de los dos hemocultivos, correspondían a los tipos killer 812 y 811 respectivamente.

### INTRODUCCION

*Candida albicans* es la especie más aislada en las infecciones por levaduras, en especial en las de tipo oportunista (3). Está presente en piel (escasamente), en membranas mucosas, vagina y en el tracto intestinal de individuos normales (2,11) por lo que es probable que el origen de las infecciones sea principalmente endógeno

### SUMMARY.

[Typification of *Candida albicans* by means of killer toxins method]

The importance and medical relevance of yeast isolated in some patient samples, has been recognized in the last few years. *Candida albicans* is the species mostly responsible for candidosis, mainly the opportunist type. The increasing number of infections by *Candida* has led to the development of the epidemiological marking methods in order to find the most frequent types.

161 strains of *C. albicans*, isolated from different anatomical sources, were studied by applying the typing method through killer toxins of Polonelli et al.

Forty eight different types of killers were found the most frequent being the 812, 111, 811 and 712. Nevertheless, there was not a particular association between the killer type found and the anatomical region from which the samples came from according to the clinical picture.

Nevertheless, epidemically in a corioamnionitis and fungemia case, it was possible to establish that the isolated strains in the former amniotic liquid and uterus scraping, and in the second of the two hemocultures, the isolated strains belonged to the 812 and 811 killer types respectively.

(10,30,34). Para su desempeño como hongo oportunista requiere de la existencia de diversos factores predisponentes, resumidos ampliamente en la literatura (3, 4, 11, 12, 13, 15, 23, 29, 31).

Apesar del reconocimiento de la importancia clínica de *C. albicans*, *C. tropicalis* u otras especies, hay una clara deficiencia en nuestra capacidad de prevenir y diagnosticar estas infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. La aplicación de métodos para identificar sus especies y establecer tipos, puede

\* Trabajo financiado con fondos del proyecto S-86-08 de la dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile.

mejorar nuestro conocimiento al respecto (4, 20) así como el poder discriminar entre colonización y enfermedad (4, 13, 16, 23).

La determinación de perfiles fenotípicos o genotípicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* u otras puede proporcionar las bases para estudios destinados a resolver interrogantes de carácter epidemiológico o de patogenicidad, como ser el rol de la variación de la colonia en la colonización crónica y en la recurrencia de la infección, la frecuencia y mecanismo paciente-paciente y personal hospitalario-paciente, en la diseminación de la *C. albicans*. Así, la diferenciación colonial puede ser potencialmente útil en interpretar cultivos y establecer protocolos profilácticos o terapéuticos. Particularmente si fuesen encontrados uno o más fenotipos en infecciones invasivas (20,22).

Tradicionalmente, la identificación de *C. albicans* se ha basado en criterios bioquímicos y morfológicos. Métodos serológicos han sido usados para tipificarla, conociéndose sólo los serotipos A y B, lo que hace limitado el método (7, 8, 9).

Otros métodos desarrollados son: el resistotipo (33), biotipos (18,19), caracterización por perfiles enzimáticos (3), análisis de DNA (29), morfotipo (22), entre otros.

Bevan y Makower en 1963 (1) informaron en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, la producción de sustancias letales que se denominan toxinas "killer", tóxicas para cepas de la misma especie u otros hongos. Philliskirk y Young (21), hallaron que esta característica estaría expresada en forma más notoria en el género *Hansenula*. Con posterioridad se demostró que estas toxinas actúan también sobre bacterias (26).

En 1983, Polonelli et al. (24), aplicando los conceptos sobre toxinas killer, desarrollaron un método de marcaje epidemiológico para *C. albicans* de acuerdo a los factores de susceptibilidad de las cepas estudiadas frente a un set de levaduras productoras de toxinas killer.

Ciertos tipos de cepas killer están siendo usadas en la industria de licores y en la obtención de cepas industriales.

Considerando los antecedentes previos, desarrollamos el método de Polonelli et al. (24), procediendo a identificar epidemiológicamente cepas de *C. albicans* aisladas en Valdivia, de diversos orígenes con el objetivo de establecer los tipos killer más frecuentes, determinar la posible relación entre los tipos killer encontrados, el sitio de infección y la recurrencia, así como conocer la estabilidad y viabilidad de las cepas productoras de toxinas killer.

## MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 161 cepas de *C. albicans* aisladas en Valdivia, identificadas por el método del tubo germina-

tivo, aplicando luego el método de tipificación por toxinas killer descrito en 1983 por Polonelli et al. (24). El origen y número de las muestras se detalla en la Tabla 1.

Las cepas de levaduras aisladas e identificadas como *C. albicans*, son sembradas en 10 ml. de caldo peptona extracto de levadura glucosado (YEPD) o caldo Sabouraud pH 4,5 e incubadas por 18 hrs. a 25°C con agitación constante (120) rpm.

Se toma 1 ml del cultivo y se diluye en 10 ml. de caldo YEPD, ajustando la turbidez a un 25% de transmitancia, leída a 530 nm. Luego 1 ml de la suspensión se incluye en 20 ml. de agar YEPD con azul de metileno al 0,003%.

Se deja solidificar el agar y posteriormente se le estra con cada una de las cepas killer en la superficie. Se incuban a 25°C por 72 horas.

TABLA 1.

Cepas de *C. albicans* estudiadas para marcaje epidemiológico con toxinas killer. Valdivia, Chile, 1989.

ORIGEN	Nº
Vaginal	78
Desgarro	17
Piel	15
Uña	11
Endocervical	9
Orofaringea	9
Orina	2
Hemocultivo	2
Líquido amniótico	1
Raspado uterino	1
Herida	1
Rectal	1
Otros	14
<b>TOTAL</b>	<b>161</b>

### Lectura de las Placas:

Se consideró que hubo actividad lítica por las cepas killer cuando alrededor de la estra de la cepa respectiva se observaba una zona clara de inhibición y/o una región de células teñidas con azul de metileno.

Cuando ninguno de estos efectos fué observado, se consideró negativa la actividad killer.

### Interpretación del tipo Killer:

Para combinar el efecto de las 9 cepas killer, se agruparon en tres tripletes como se detalla en la Tabla 2.

A modo de ejemplo, una *C. albicans* que fué resistente a las tres primeras cepas killer (k1, k2, k3), sensible al segundo triplete y sensible a k7 y k8 pero resistente a k9, correspondió al tipo killer 812.

Las cepas productoras de toxinas killer fueron mantenidas en su envase original por dos años, siendo repicadas cada seis meses en agar Sabouraud para la obtención del set de trabajo y verificar su estabilidad. Para esto se eligieron 32 cepas de *C. albicans* en forma aleatoria.

**TABLA 2.**  
Interpretación y codificación de las cepas killer (Polonelli et al., 1983).

Act. 1° Triplete			Act. 2° Triplete			Act. 3° Triplete					
K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9			
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

- : Resistente + : Sensible

**RESULTADOS.**

En la tabla 3 se detallan los tipos killer de 161 cepas de *C. albicans* de diferente origen, aisladas en Valdivia. En total se obtuvieron 48 tipos killer diferentes, de los cuales el 812 fué el más frecuente, siendo representado por 25 cepas, correspondiendo al 15,5% del total estudiado. Otros tipos killer frecuentes fueron el 111 con 16 cepas (9,9%), el 811 y 712 cada uno 11 cepas respectivamente (6,8%) y el 511 con 8 cepas (4,9%).

En la tabla 4 se encuentran las frecuencias respectivas para cada modelo de tipo killer obtenido según origen. Veintiseis tipos killer estuvieron repetidos a lo menos una vez. Cada uno de ellos provenía de cepas de distintas regiones anatómicas, salvo en cuatro modelos (tipo killer 624, presente sólo en dos cepas obtenidas de desgarro; y los tipos killer 316, 722 y 721 encontrados dos veces respectivamente en cepas de origen vaginal). Entre las 78 cepas de origen vaginal, el tipo killer más frecuente fué el 812, hallado en 12 aislamientos. El 111 se presentó en 7 cepas. El tipo killer 811 se encontró en 6 cepas de *C. albicans* y los tipos 511 y 311 se observaron en 5 cepas

cada uno respectivamente. Hubo en total 33 tipos killer para las cepas de este origen. En las cepas vaginales 17 tipos killer están repetidos más de una vez, las cepas restantes correspondieron cada una a un tipo killer diferente.

Las cepas de *C. albicans* provenientes de desgarro, presentaron 13 tipos killer distintos. De estos los más frecuentes fueron el 211, 624, 844 y 712 (Tabla 4).

En las 15 cepas obtenidas de piel, observamos un total de 8 tipos killer. Los más frecuentes fueron el 111 y 712; el primero con 3 y el segundo con 2 cepas respectivamente (Tabla 4).

De los 10 modelos de tipo killer hallados para *C. albicans* provenientes de uña, sólo el 812 estuvo repetido. En las cepas aisladas de orina se encontraron 2 tipos killer. En orofaringe fué posible observar 8 tipos en 9 cepas de *C. Albicans* estudiadas, repitiéndose sólo el 812 (Tabla 4).

Los principales porcentajes de susceptibilidad de las cepas de *C. albicans* frente a cada cepa killer corresponden a la cepa killer K8 y K5, con un 90,7% y un 87,6% respectivamente (Tabla 5).

En la tabla 6 se destacan dos ejemplos de aplicación epidemiológica del marcaje por toxinas killer. Uno en un caso de corioamnionitis por *Candida* y el otro de candidemia.

Se encontró que las cepas productoras de toxinas killer estaban viables después de dos años de almacenamiento a 4°C. A su vez, se observó que su tipo killer se mantenía desde el inicio de este trabajo (Tabla 7).

**TABLA 5**

Porcentaje de susceptibilidad individual de cepas de *C. albicans* frente a las cepas killer.

CEPAS KILLER	<i>C. albicans</i> inhibidas	
	Nº	%
K1	49	30,4
K2	60	37,3
K3	55	34,2
K4	128	79,5
K5	141	87,6
K6	133	82,6
K7	130	80,7
K8	146	90,7
K9	81	50,3

**Tabla 3**

**Tipos killer de cepas de *C. albicans* aislada en Valdivia, Chile 1988-1989**

TIPOS KILLER DE <i>C. albicans</i>	Nº CEPAS	%
812	25	15,5
111	16	9,9
811	11	6,8
712	11	6,8
511	8	4,9
311	6	3,7
687	5	3,1
211	5	3,1
842	5	3,1
611	5	3,1
612	5	3,1
816	4	2,5
512	3	1,9
044	3	1,9
411	3	1,9
686	3	1,9
412	3	1,9
316	2	1,2
721	2	1,2
822	2	1,2
711	2	1,2
722	2	1,2
113	2	1,2
884	2	1,2
312	2	1,2
524	2	1,2
848	1	0,6
644	1	0,6
247	1	0,6
838	1	0,6
742	1	0,6
846	1	0,6
846	1	0,6
642	1	0,6
214	1	0,6
622	1	0,6
752	1	0,6
827	1	0,6
745	1	0,6
857	1	0,6
653	1	0,6
587	1	0,6
882	1	0,6
284	1	0,6
442	1	0,6
831	1	0,6
652	1	0,6
682	1	0,6
242	1	0,6
TOTAL	161	100

**Tabla 4**

**Modelos de tipo killer de cepas de *C. albicans* según muestra clínica (método de Palonelli et al.) Valdivia 1988-1989**

\* Incluye orina, líquido amniótico, raspado uterino, herida, rectal, orofaringe y hemocultivo

TIPOS KILLER <i>C. albicans</i>	MUESTRA CLINICA						TOTAL	%
	VAGINAL	DESGARRO	ENDOCERVICAL	PIEL Y UÑA	OTROS*			
812	12	1	3	4	5	25	15,5	
111	7	0	0	2	7	16	9,9	
811	6	1	1	1	2	11	6,8	
712	4	2	1	2	2	11	6,8	
511	5	1	1	1	0	8	4,9	
311	5	0	0	0	1	6	3,7	
687	3	0	0	0	2	5	3,1	
211	2	2	0	0	1	5	3,1	
842	2	1	0	1	1	5	3,1	
611	2	1	0	1	1	5	3,1	
612	2	0	1	1	1	5	3,1	
816	2	1	0	1	0	4	2,5	
512	1	0	0	1	1	3	1,9	
044	1	2	0	0	0	3	1,9	
411	2	0	0	0	1	3	1,9	
686	1	0	0	1	1	3	1,9	
412	2	0	0	0	1	3	1,9	
624	0	2	0	0	0	2	1,2	
316	2	0	0	0	0	2	1,2	
721	2	0	0	0	0	2	1,2	
822	1	0	0	0	1	2	1,2	
711	1	1	0	0	0	2	1,2	
722	2	0	0	0	0	2	1,2	
113	0	0	0	2	0	2	1,2	
884	1	0	0	0	1	2	1,2	
312	1	0	0	1	0	2	1,2	
848	0	1	0	0	0	1	0,6	
644	0	0	0	1	0	1	0,6	
247	0	0	0	1	0	1	0,6	
838	0	0	0	1	0	1	0,6	
742	1	0	0	0	0	1	0,6	
846	0	0	0	1	0	1	0,6	
642	0	0	1	0	0	1	0,6	
214	1	0	0	0	0	1	0,6	
622	0	0	0	1	0	1	0,6	
752	1	0	0	0	0	1	0,6	
827	0	1	0	0	0	1	0,6	
745	1	0	0	0	0	1	0,6	
857	0	0	0	1	0	1	0,6	
653	0	0	1	0	0	1	0,6	
587	1	0	0	0	0	1	0,6	
882	0	0	0	0	1	1	0,6	
284	1	0	0	0	0	1	0,6	
442	1	0	0	0	0	1	0,6	
831	1	0	0	0	0	1	0,6	
652	1	0	0	0	0	1	0,6	
682	0	0	0	1	0	1	0,6	
242	0	0	0	0	1	1	0,6	
TOTAL	78	17	9	26	31	161	100	

TABLA 6.

**Tipos killer en dos casos clínicos: Evidencias epidemiológicas. Valdivia, Chile 1988-1989.**

Caso	Nº Cepa	Muestra	T. Killer	Diagnóstico
I	742	Liq. amniótico	812	Corioamnionitis
	743	Raspado Uterino	812	
II	210	Sangre	111	Fungemia
	205	Sangre	111	

## DISCUSION.

Diversas publicaciones han demostrado que *C. albicans* es responsable de cuadros clínicos adquiridos intrahospitalariamente (11, 20, 23, 32). Ghannoum et al. (6) estudiaron la distribución de estas levaduras en distintas áreas del organismo.

El desarrollo de métodos de marcaje epidemiológico para este hongo levaduriforme (5, 14, 17, 24, 33) han permitido establecer en distintos casos clínicos, si estas infecciones son recidivas, reinfecciones, o como demuestra Rios et al. (28), en un caso de corioamnionitis, que las levaduras (*C. albicans*) encontradas en líquido amniótico, raspado uterino y contenido gástrico de un recién nacido, correspondían al mismo biotipo.

Soll et al. (31) usando un método más sofisticado y preciso, como es el de Southern Blot, encontraron que cepas aisladas de 12 diferentes regiones anatómicas, paralelamente a la primera infección vaginal, podían ser separadas en 3 categorías, lo que representó 3 cepas genéticamente diferentes. La misma cepa de *C. albicans* fué responsable en tres episodios de vaginitis recurrente, mostrando que el método de análisis de DNA es de gran precisión para establecer si estas infecciones recurrentes corresponden a reinfección o recidivas.

En nuestro estudio, la tipificación por toxinas killer, parece ser una buena herramienta de marcaje epidemiológico al permitir determinar en las cepas de *C. albicans*,

un caso de corioamnionitis y otro de sepsis, donde la levadura aislada correspondía al mismo tipo killer. En el primer caso se aislaron 2 cepas de *C. albicans*, una proveniente de útero y la otra aislada de líquido amniótico, ambas presentaron el tipo killer 812. En el segundo caso, las 2 muestras de sangre tomadas a diferentes tiempos al paciente, correspondieron a *C. albicans* y al tipo killer 111 (Tabla 6). Esto también fué observado por Gallardo con el método de Odds y Abbott (5).

En nuestro estudio se encontró que todas las cepas de *C. albicans* fueron sensibles a alguna toxina, lo que concuerda con lo observado por Polonelli et al. (25). Este hecho sugiere el uso de métodos estandarizados para poder comparar resultados. Los mismos autores desarrollaron un sistema de diferenciación computarizado de cepas de *C. albicans* usando toxina killer purificada en lugar de cepas productoras, encontrando que con esta modificación mejoraba la estandarización del sistema. Esto disminuye las diferencias de tiempo de crecimiento y metabolismo de diversas cepas killer para la producción de sus toxinas y la necesidad de mantener estable el set de levaduras productoras con resiembras frecuentes, (estables a 4°C). El análisis computarizado de datos evita además, una interpretación subjetiva de los resultados, como podría haber ocurrido con el método desarrollado aquí.

En concordancia con lo encontrado por Polonelli et al. (24) no evidenciamos una asociación particular entre el tipo killer hallado y la región anatómica del cual proviene la muestra, lo que se relaciona también con lo observado por Gallardo (5), que usando el método de resistotipo llegó a iguales resultados. Lo destacable es que un individuo, al parecer, es colonizado por un solo tipo killer. Aún así, los tipos killer más frecuentes fueron en flujo vaginal, el 812, 111, 811, 511 y 311 (Tabla 4). En 1986, Polonelli et al. (27) estudiaron el uso de toxinas killer para eventuales tratamientos en relación al tipo killer encontrado en el paciente. En infecciones, en animales de experimentación con *M. furfur* y *M. pachydermatis* de origen cutáneo o del conducto auditivo externo, observaron que al aplicar tópicamente una toxina killer concentrada, los cultivos de control eran negativos.

El método de tipificación es práctico, fácil de ejecutar, no requiere de equipos sofisticados a diferencia del método de análisis de DNA (29). Sólo necesita contar con las cepas tipificadoras y el agar y/o caldo YEPD. Las cepas aportadas por Polonelli et al. (24) son estables como marcadores, como se puede apreciar en la tabla 7.

**TABLA 7**  
**Estabilidad en el tiempo del tipo killer de *C. albicans***

N° CEPA	TIPO KILLER		
	1ª DETERMINACION (OCT.-87)	2º DETERMINACION (MAYO-88)	3ª DETERMINACION (AGO.-89)
742	743	812	812
1380	651		
3320	4480		
750	1773	687	687
1669		111	111
58	499	816	816
666		722	722
Ñ41	70	842	842
2288	860	811	811
135	646		
1604	2787	316	316
710	4138	612	612
17			
676	10	686	686
347			
371		284	284
764	768	884	884
2712	447	611	611
475			

**REFERENCIAS**

- 1.- Bevan, E.A. y M. Makower (1963). The physiological basis the killer character in yeast. In: S.J. Geerts (ed.), Genetics today. XI th International Congress on Genetic 1 : 202-203
- 2.- Bonfante, R. y S. Barroeta (1968). Development and evaluation of a rapid identification test for *Candida Albicans*. Mycopathology 34 : 33-39
- 3.- Casal Roman, M. y M. J. Linares Sicilia (1983). Preliminary investigation of *Candida albicans* biovars. J. Clin. Microbiol. 18: 430-431
- 4.- Fung, J.C.; M. Donta y R.C. Tilton (1986). *Candida* detectionsystem (CAND-TEC) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. J. Clin. Microbiol. 24 : 542-547
- 5.- Gallardo, A. (1989). Tipificación de cepas de *Candida albicans* por el método de resistotipo, modificado. Seminario de Titulación, Escuela Tecnología Médica, Univ. Austral de Chile.
- 6.- Ghannoum, M. A.; M. S. Motawy; A. L. Al-Mubarek y H. A. Al-Awadhi (1985). *Candida albicans* strains differentiation in cancer patients undergoing therapy. Mykosen 28 : 388-393
- 7.- Hasenclever, H. F. y W. O. Mitchell (1961). Antigenic studies of *Candida* I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 82 : 570-573
- 8.- Hasenclever, H.F.; W. O. Mitchell y J. Loewe (1961). Antigenic studies of *Candida* II. Antigenic relation of *Candida albicans* group A and group B to *Candida stellatoidea* and *C. tropicalis*. J. Bacteriol. 82 : 574-577
- 9.- Hasenclever, H. F. y W. O. Mitchell (1961). Antigenic studies of *Candida* III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* group A, group B and *Candida stellatoidea*. J. Bacteriol. 82 : 578-581
- 10.- Horowitz, B. J.; S. W. Edelstein & L. Lippman (1987). Sexual transmission of *Candida*. Obst. & Gynec. 69 : 883-886
- 11.- Huben, H. & H. Hauck (1988). Characterization of *Candida albicans* strains found in patients of three intensive care units. Mycoses 31 : 418-422
- 12.- Lacaz, C. da S. (1977). Infecções por agentes oportunistas. (Ed.) Edgard Blüncher Ltda. Brasil.
- 13.- Lacaz, C. da S. (1980). Candidiases. (Ed.) Pedagógica e universitária Ltda. Editora da Universidade de São Paulo, Brasil.
- 14.- Mc Creighth, M.C. & D.W. Warnock (1982). Enhanced differentiation of isolates of *Candida albicans* using a modified resisto gram method. Mykosen 25 : 589-598
- 15.- Mc Cue, J.D. (1989). Evaluation and management of vaginitis. Arch. Intern. Med. 149 : 565-568
- 16.- Medoff, G. (1981). Treatment of infection caused by *Candida*, in Schlessinger, D. (Ed.) Microbiology A.S.M. pp. 215-217
- 17.- O'Connor, M. I. & J. D. Sobel (1986). Epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis: Identification and strain differentiation of *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 154 : 358-363

- 15.- Odd, F. C. & A. B. Abbott (1980). A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*. 18 : 302-317
- 16.- Odd, F.C. & A.B. Abbott (1983). Modification and extension of test for differentiation of *Candida* species and strains. *Sabouraudia*. 21 : 79-81
- 17.- Pfaller, M. A. (1987). Strain variation among *Candida* species: application of various typing methods to study the epidemiology and pathogenesis of candidiasis in hospitalized patients. *Inf. Control* 8 : 273-275
- 18.- Phillipsbrick, G. & T.W. Young (1975). The occurrence of killer character in yeast of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek* 41: 147-151
- 19.- Phongpaichit, S.; D.W.R. Mackenzie & C. Fraser (1987). Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidem. Inf.* 99 : 412-428
- 20.- Platenkamp, G.J.; A.M. Van Duin; J.C. Porsius; H.J. Aschouten; P.E. Zondervan, M.F. Michel (1987). Diagnosis of invasive candidiasis in patients with and without signs of immune deficiency: A comparison of six detection methods in human serum. *J. Clin. Pathol.* 40 : 1162-1167
- 21.- Polonelli, L.; C. Archibusacci; M. Sestito, G. Morace (1983). Killersystem: A simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.* 17 : 774-780
- 22.- ———; M. Castagnola; D.V. Rossetti, G. Morace (1985). Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycopathologia* 91 : 175-179
- 23.- ———; & G. Morace (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.* 24 : 866-869
- 24.- ———; R. Lorenzini; F. De Bernardis, G. Morace (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia*. 96 : 103-107
- 25.- Ríos, R.; R. Aguilar, L. Zaror (1988). Corioamnionitis por *Candida* asociada a dispositivo intrauterino. *Rev.Chil. Obstet. Ginecol.* 53 : 297-298
- 26.- Scherer, S. & D. A. Stevens (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J.Clin. Microbiol.* 25 : 675-679
- 27.- Sobel, J. D (1986). Recurrent vulvovaginal candidiasis. *N.Engl.J.Med* 315 :1455-1458
- 28.- Soll, D, R.; R. Galask; S. Isley; T. V. Gopalarao; D. Stone; J. Hockis; J. Schmid; K. Mac; H. Craig.(1989). Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 681-690
- 29.- Somerville, D. A. (1972). Yeast in a Hospital for patients with skin diseases. *J.Hyg.Camb.* 70 : 667.675
- 30.- Warnock, D.W.; D.C.E. Speller; J. D. Milne; A.L. Hilton; P. I. Kershaw. (1979). Epidemiological investigation of patients with vulvovaginal candidosis. *Brit.J.Ven.Dis.* 55 : 357-361
- 31.- Zimmerman, B & E. Weber. (1985). *Candida* an "20th-century disease. *Can.Med.Assoc.J.* 133 : 965-966