

**«PREVALENCIA DE LEVADURAS EN LA VAGINA DE VACA
Y OVEJA, SU PATOGENICIDAD EXPERIMENTAL PARA EL
RATON Y SENSIBILIDAD FRENTA A DIFERENTES
ANTIFUNGICOS»**

Por José Miguel Aller Gancedo

INDICE

1. INTRODUCCION.-2. REVISION BIBLIOGRAFICA.-2.1. *Antecedentes históricos*.-2.1.1. Levaduras en el tracto genital femenino.-2.1.2. Evolución cronológica de los géneros hallados por nosotros.-2.1.3. Patogenia experimental para el ratón.-2.1.4. Antifúngicos.-2.2. *Material y Métodos*.-2.2.1. Recogida de muestras.-2.2.2. Aislamiento de cepas.-2.2.2.1. Medio y técnica de siembra.-2.2.2.2. Tipificación.-2.2.3. Patogenia experimental en ratón.-2.2.3.1. Preparación de las suspensiones celulares.-2.2.3.2. Dosis y técnica de inoculación.-2.2.3.3. Examen «post-mortem».-2.2.4. Sensibilidad a distintos antifúngicos.-2.2.4.1. Medios de cultivo.-2.2.4.2. Antifúngicos y preparación de las diluciones.-2.2.4.3. Preparación de los inóculos.-2.2.4.4. Lectura de las pruebas.-3. MATERIAL Y METODOS.-3.1. *Recogida de muestras*.-3.1.1. En la vaca.-3.1.2. En la oveja.-3.2. *Aislamiento de cepas*.-3.2.1. Medio y técnica de siembra.-3.2.2. Tipificación.-3.2.2.1. Características morfológicas.-3.2.2.2. Características culturales.-3.2.2.3. Características sexuales.-3.2.2.4. Características fisiológicas.-3.2.2.5. Otras pruebas.-3.3. *Patogenia experimental en el ratón*.-3.3.1. Preparación de las suspensiones celulares.-3.3.2. Dosis y técnica de inoculación.-3.3.3. Examen «post-mortem».-3.4. *Sensibilidad a distintos antifúngicos*.-3.4.1. Medios de cultivo.-3.4.2. Antifúngicos y preparación de las diluciones.-3.4.3. Preparación de los inóculos.-3.4.4. Lectura de las pruebas.-4. RESULTADOS Y DISCUSION.-4.1. *Aislamiento de cepas*.-4.1.1. Géneros y especies de levaduras aisladas.-4.1.1.1. En la vaca.-4.1.1.2. En la oveja.-4.1.1.3. Por otros autores.-4.1.2. Otros hongos aislados.-4.1.2.1. En la vaca.-4.1.2.2. En la oveja.-4.1.3. Frecuencia de las levaduras aisladas.-4.1.3.1. En la vaca.-4.1.3.2. En la oveja.-4.1.3.3. En otras especies.-4.1.4. Recuento de colonias.-4.2. *Patogenia experimental*.-4.3. *Sensibilidad a distintos antifúngicos*.-5. CONCLUSIONES.-6 RESUMEN.-7. AGRADECIMIENTOS.-8. BIBLIOGRAFIA.-9. ILUSTRACIONES.

* En vísperas de entregarse a la imprenta esta tesis doctoral, ha fallecido el Dr. Benito Aller Gancedo. El autor, hundido en el inmenso dolor que supone la pérdida del ser querido, desea rendirle un postrer homenaje dedicándole esta tesis, en la que se encuentran vertidas sus últimas enseñanzas, sus últimos consejos.

1. INTRODUCCION

A pesar de pertenecer las levaduras al grupo de los primeros microorganismos que se conocieron y estudiaron, hay que admitir que los procesos clínicos que causan están todavía con numerosos puntos sin resolver, pudiendo repercutir negativamente en la salud y economía ganadera.

La micopatología en los últimos años ha ido incrementando su desarrollo e importancia, merced al aumento que han experimentado las enfermedades causadas por hongos. Hasta hace poco tiempo se pensaba casi exclusivamente en procesos cutáneos de origen dermatofítico, o en procesos sistémicos generalmente de localización tropical o subtropical (coccidioidomicosis, histoplasmosis, etc.); hoy en día se tiene un criterio mucho más amplio, habiendo adquirido gran importancia las levaduras como consecuencia del creciente número de afecciones que producen.

Modernamente, no sólo han ido en aumento las formas clásicas de micosis superficiales por levaduras, sino también los procesos sistémicos, los cuales están originando problemas insolubles a los patólogos. El uso común de productos terapéuticos, como los antibióticos, esteroides, etc., parece que está íntimamente unido a un aumento de la incidencia de los procesos micóticos por levaduras.

En la actualidad, se viene comprobando en ginecología humana un incremento de las micosis levaduriformes, observándose igualmente en veterinaria, un mayor número de trastornos mamáticos y abortivos debidos a dicha etiología.

Todo lo dicho anteriormente, el escaso conocimiento que se tiene en nuestro país de los procesos micóticos por levaduras y el desconocimiento de la flora normal levaduriforme de la vagina de los animales domésticos (dato importante a la hora de establecer la flora patógena), nos ha inducido a realizar el presente trabajo. Por otro lado, al igual que se ha señalado en la mujer, hemos querido saber si existe en los animales algún factor que pueda influir en la incidencia de levaduras en la vagina.

La disminución de la eficacia de los antifúngicos normalmente empleados en la clínica diaria, es un hecho frecuentemente observado; la falta de estudios en este sentido en nuestro país, motivó el que considerásemos interesante comprobar «in vitro» la acción de diversos antifúngicos.

El hecho de que en el Departamento de Patología Infecciosa y Parasitaria se ha seguido una línea de investigación en el campo de las levaduras, con trabajos previos sobre patogenicidad y estudios de su incidencia en leche de abasto y en vagina humana, nos ha inclinado a determinar la capacidad patogénica de las levaduras aisladas y a continuar en la susodicha línea de trabajo.

En relación con lo anteriormente expuesto se planteó el presente trabajo.

cuyos objetivos fueron los siguientes: el conocimiento del tipo y prevalencia de la flora levaduriforme de la vagina de vaca y oveja; la comprobación de la posible patogenicidad de la flora levaduriforme existente; y la confrontación de la sensibilidad «in vitro» de las levaduras aisladas frente a diferentes antifúngicos de uso normal en la clínica.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1680, el holandés Leeuwenhoek realiza la primera observación microscópica de levaduras (WINNER y HURLEY, 1964).

La fermentación alcohólica del azúcar, que tiene lugar en líquidos como el vino y la cerveza era un hecho conocido desde antiguo. Cagnard-Latour en 1836 y Schwann en 1837 descubren que dicho fenómeno se debía a la intervención de ciertos microorganismos, que recibirían el nombre de levaduras, de acuerdo con la palabra con que se designaba este hecho (LODDER y KREGER-VAN RUIJ, 1967).

Se puede decir que la micología veterinaria se convierte en una rama de la medicina veterinaria, a partir de la primera mitad del siglo XIX, cuando se conoció la facultad de los hongos para producir enfermedades en los animales, plantas y hombre (AINSWORTH y AUSTWICK, 1973). Agostino Bassi en 1835 cita el primer caso de enfermedad producido por hongos, (en el gusano de seda) atribuyéndose al que posteriormente sería denominado *Botrytis bassiana*. Con los trabajos de Langenbeck, que en 1839 descubre el hongo causal de aftas bucales, y los de Schoenlein, que en el mismo año halla el productor de una forma de dermatofitosis, queda firmemente establecida la micología médica (WINNER y HURLEY, 1964).

2.1.1. Levaduras en el tracto genital femenino.

Las primeras citas de hongos en vagina y aparato genital se refieren a la especie humana, existiendo discrepancias entre los diferentes autores, a propósito de quién sería el primero que las inició. Según GRASSET y col. (1954), la noción de micosis vaginal es dada por Blaye en 1828. QUADRAS-BORDES y QUADRAS-BORDES (1959), citan que fue Langenbeck en 1839, el descubridor del primer hongo hallado en la vagina de una mujer que había fallecido de fiebre tifoidea. JACKSON (1956). CARTER y col. (1940), AGUERO y FEO (1963), citando a Castellani, atribuyen a Wilkinson en 1840 el primer descubrimiento de levaduras en el flujo vaginal. WINNER y HURLEY (1964), consideran que la primera descripción de candidosis vaginal es la que realiza Wilkinson en 1849; asimismo, informan que Mayer en 1862, cita varios casos de aftas vaginales, y cómo Castellani en 1916, señala que las levaduras pueden estar presentes en la vagina humana sin llegar a causar síntomas.

Dentro ya del campo veterinario se comprueba que los hongos y más concretamente las levaduras, pueden causar el llamado aborto micótico. En este sentido, SMITH (1920) llama la atención sobre la intervención de hongos en un caso de aborto bovino, al aislar *Rhizopus rhizophilus* de las membranas fetales. BENDIXEN y PLUM (1929), describieron diecisiete casos de aborto micótico, en los que observaron los cambios característicos que se producen en la placenta. AUSTWICK y VENN (1957) aislaron *Candida tropicalis* del contenido estomacal de un feto y dieron con ello la primera referencia de aborto por una levadura. AINSWORTH y AUSTWICK (1973) en una revisión mundial de abortos micóticos (vaca, oveja, etc.) recopilan como agentes causales 40 especies de hongos, entre los cuales se encuentran 11 levaduras, predominando el género *Candida* con siete, además de *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Trichosporon* con una.

En cuanto a la procedencia de las levaduras, inocuas o no, que contaminan la vagina en el caso de la mujer, Yo Bwan Hie indica que provienen principalmente de las heces, y Magara señala

que el tracto urinario representa también un reservorio, a partir del cual la vagina puede infectarse y reinfecarse (VAN UDEN, 1960).

REICH y NECHTOW (1949) comprobaron un caso de infección y posterior reinfección de candidosis vaginal en una mujer, debido a la convivencia con dos perros que presentaban vaginitis y penitis por *Candida albicans*.

FREITAS y col. (1960-62) examinando bacteriológicamente 357 muestras de cuello y útero de yeguas, aislaron levaduras en 8 casos clínicos en los cuales se habían usado antibióticos durante largo tiempo.

BISPING (1963) recogió muestras vaginales de vacas y yeguas, siendo positivas el 8,2 % de las primeras (*Candida, Torulopsis y Rhodotorula*) y el 10,4 % de las segundas (*Candida, Torulopsis, Rhodotorula y Trichosporon*); también estudió muestras de toros, resultando positivas el 2,2 % de las procedentes de prepucio (*Torulopsis, Rhodotorula y Trichosporon*) y el 1,1 % de las de semen (*Torulopsis y Rhodotorula*).

TURNER (1965), a partir de 33 vacas que habían abortado, encontró *C. tropicalis* en el moco uterino de 4 de ellas, así como en cinco de 29 vacas sin historial abortivo.

LYSENKO y MOLORADOVICH (1966), de 32 vacas con fluido vaginal patológico y 5 fetos abortados, aislaron 36 cepas de *C. albicans* y 1 de *C. tropicalis*.

AL-DOORY y col. (1967) encontraron hongos en el 61 % de las muestras vaginales procedentes de monas, representando las diversas levaduras (*Candida, Trichosporon, Geotrichum, Cryptococcus, etc.*) el 86,2 % de los aislamientos.

ZVEREVA y REPKO (1968), estudiando semen de toros dedicados a inseminación artificial, hallaron hongos en el 64 % de las muestras (*Candida* y filamentosos) y comprobaron que las vacas inseminadas por estos toros presentaban un menor número de concepciones, mayor incidencia de abortos y de muertes entre los recién nacidos. ROB y TOMAN (1970), también observaron un descenso de fertilidad con los eyaculados más contaminados.

MALICKA (1969), examinó la membrana mucosa vaginal de 50 perras, objeto de necropsias, hallando *Candida* spp. en el 14 %, sin que se hubieran producido lesiones.

NUNN (1970) observó la flora bacteriológica de vagina y cuello uterino, de 133 vacas infértils, aislando principalmente *Bacillus, Staphylococcus, Streptococcus* y también algún *Aspergillus*.

KRABISCH (1971), recogiendo muestras de cervix de 424 yeguas, aisló levaduras en el 9,6 %, pertenecientes a los géneros *Candida, Torulopsis y Rhodotorula*.

WAWRKIEWICZ y GALEZA (1972), a partir de vagina y útero de vacas de abasto y semen de toros, aislaron *Candida* spp., *Torulopsis, Geotrichum, Aspergillus*, etc.

MORENO y col. (1973), examinaron la flora bacteriológica vaginal de 100 perras que presentaban alteraciones genitales, encontrando que en 7 casos además de bacterias creció *Candida albicans*.

DECUN y ROSU (1973) estudiaron la secreción cervical de vacas en estado normal y patológico, llegando a aislar *Candida, Mucor* y *Aspergillus*.

HAJSIG y col., de la Facultad de Veterinaria de Zagreb, realizaron varios trabajos entre los años 1962-74, que se citan a continuación:

HAJSIG, SETINSKI y TOPOLKO (1962), a partir de la superficie de la porción vaginal del cuello y del útero de 199 vacas y novillas previamente sacrificadas en el matadero, aislaron levaduras (*Candida, Debaryomyces, Rhodotorula, Torulopsis y Trichosporon*) en el 37,2 % de las muestras de cuello y en el 5 % de las de útero. HAJSIG y SETINSKI (1963), examinando 223 vacas y novillas, con y sin inflamación de genitales, gestantes o no, encontraron positivas a levaduras el 8,96 % (*Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Debaryomyces y Trichosporon*). HAJSIG, KOPLJAR y STEFICIC (1964), infectaron experimentalmente 24 novillas en diferentes fases del ciclo sexual, por vía intrauterina o intravaginal, con *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, comprobando que estas especies podían provocar endometritis, mientras que con *C. guilliermondii* el resultado era negativo. KOPLJAR y col. (1966), realizaron la infección en vagina y cuello uterino de 30 novillas maduras sexualmente, con especies de los géneros *Trichosporon, Debaryomyces, Rhodotorula y Torulopsis*, previamente aisladas de anteriores trabajos, observando que provocaban menos inflamación que la producida por las candidas citadas anteriormente. HAJSIG y TOPOLKO (1967) examinando el contenido uterino de 4 vacas con endometritis mucopurulenta, aislaron *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*; a su vez encontraron *Saccharomyces fragilis*, *Trichosporon capitatum* y *C. krusei* en el contenido gástrico de fetos procedentes de tres vacas que abortaron en

la segunda mitad de la gestación. HAJSIG, KOPLJAR y LUKACEVIC (1968), infectaron experimentalmente, en vagina o útero, 5 vacas y 18 novillas, inoculando *Hansenula anomala* previamente aislada de semen de toro (LUKACEVIC y col. 1963), observando que el útero y la vagina se inflamaban levemente cuando la infección se realizaba en la fase luteínica. HAJSIG (1966), observó «in vivo» e «in vitro» el antagonismo existente entre algunas levaduras y bacterias aisladas de genitales de vaca, ya que a menudo el aumento de bacterias producía una reducción paralela en la cantidad de levaduras. No obstante, KOPLJAR, HAJSIG y STRAHONJA (1972), pudieron comprobar en 20 novillas infectadas experimentalmente, que asociando *Hansenula anomala* o extracto de ella con *Corynebacterium pyogenes*, se favorecía el desarrollo de las corinebacterias y su patogenicidad. HAJSIG, HERAK y VRBANAC (1974), después de sacrificar 34 cerdas infértils, encontraron *Torulopsis glabrata* en el contenido uterino de siete de ellas.

2.1.2. Evolución cronológica de los géneros hallados por nosotros.

Las especies actualmente pertenecientes al género *Candida* estuvieron incluidas a través de los años en muy diversos géneros. Como ejemplo de la gran disparidad de criterios existentes en cuanto a denominaciones, podemos fijarnos en la especie tipo del género, *C. albicans*, de la que LODDER (1970) cita nada menos que 100 sinónimos.

Robin en 1853, denominó *Oidium albicans* a la levadura hallada anteriormente por Langenbeck en 1839 y Gruby en 1842 (JUNGERMAN y SCHWARTZMAN, 1972).

Quinquaud en 1868, la denominó *Syringospora robinii*, ya que el nombre de *Oidium* incluía la forma conidial de *Erysiphaceas* (LODDER y KREGER-VAN RIJ, 1967).

Zopf en 1890, la incluyó como *Monilia albicans*, (JUNGERMAN y SCHWARTZMAN, 1972), denominación que habría de extenderse fuertemente ya que incluso hoy en día algunos autores hablan aún de monilias.

Will en 1916, creó el género *Mycotorula* para referirse a las cándidas (LODDER, 1970).

Berkhout en 1923, propuso el género *Candida* para designar aquellas levaduras que estaban incorporadas incorrectamente en el género *Monilia*, el cual en virtud del principio de prioridad, estaba ya reservado para las formas imperfectas del género *Sclerotinia*, moho fitopatógeno de las frutas (JORGENSEN y HANSEN, 1959).

Languerón y Guerra en 1938 se inclinaron por el nombre de *Candida*, siendo secundados por Diddens y Lodder en 1942, quienes a su vez designaron a *C. albicans* como especie tipo del género. En 1959, en el «Noveno Congreso Internacional de Botánica de Montreal» fue aceptado el nombre de *Candida* como «nomen conservandum» (LODDER, 1970).

LODDER y KREGER-VAN RIJ (1967) en el libro «The Yeast» incluyeron dentro del género *Candida* 30 especies con 6 variedades. Posteriormente LODDER (1970) en la siguiente edición de dicho libro, cita 81 especies y 7 variedades, de las que describe 71 y 4, respectivamente, llevando las restantes 10 especies y 3 variedades a otros géneros.

BARNETT y PANKURST (1974) en «A new key to the yeasts» recopilaron con fecha 30 de noviembre de 1972, las especies señaladas por Lodder en 1970 y añadieron 33 nuevas. RAMÍREZ (1974) cita las especies de Lodder de 1970 y describe 35 especies y 1 variedad nuevas, descritas hasta principios de 1974.

En relación con el género *Pichia*, Hansen en 1904, separó del género *Saccharomyces* aquellas especies que forman rápidamente película en medios líquidos y crea con ellas dos nuevos géneros, *Pichia* y *Willia*; en 1912, Klocker designó a *Pichia membranafaciens* como especie tipo del género y en 1924, estableció dos subgéneros, *Pichia* y *Zygotrichia*; a su vez Mrak y col. en 1942, incluyen *Pichia* y *Hansenula* en un mismo género, no aceptándolo otros autores (LODDER y KREGER-VAN RIJ, 1967). Posteriormente, LODDER (1970) opina que está muy lejos de haberse encontrado la última delimitación de este género.

LODDER y KREGER-VAN RIJ (1967) admitieron cuatro especies dentro del género *Pichia*, pero posteriormente fueron aumentadas a 35, incluyendo 2 variedades (LODDER, 1970). Por último BARNETT y PANKURST (1974) describieron 10 nuevas especies.

2.1.3. Patogenia experimental en ratón.

Parece ser que la primera noticia sobre la transmisión de una candidosis, corresponde a la realizada por Berg en 1846, quien fue capaz de reproducir las lesiones «of thrush» inoculando el

hongo en la boca de voluntarios humanos sanos. Años más tarde Delafond en 1858, es capaz de transmitir la candidosis a corderos debilitados. Klemperer en 1885, inoculó el hongo por vía sanguínea a cobayos, determinando una candidosis sistémica mortal, lo que es confirmado posteriormente por Stoos en 1895 y Steiner en 1898. Stoecklin en 1898, señaló que todas las experiencias con dicho hongo indicaban su patogenicidad para los animales de laboratorio. En esta primera época los investigadores comprobaron su patogenicidad para el ratón, por vía intravenosa e intraperitoneal. A su vez coinciden en que el órgano más afectado en los animales, es el riñón, tanto en la zona cortical como medular; en el sistema nervioso central no se presentan lesiones macroscópicas, pero sí pueden observarse de tipo microscópico; el estómago e intestinos pueden estar ocasionalmente afectados, mientras que el hígado y bazo no lo están nunca (WINNER y HURLEY, 1964).

Redaelli en 1924 inoculó *C. albicans* a cobayos, ratas y conejos, intravenosamente, y observó que el riñón es el órgano más alterado, considerando que las lesiones son de origen embólico producidas por los organismos. Stovall y Pessin, en 1933-34, no estuvieron de acuerdo con la teoría «embólica» de Redaelli y afirmaron que hay especies de *Candida* que tienen mayor diámetro que *C. albicans* y sin embargo no son patógenas para los animales de laboratorio; asimismo demostraron la existencia de septicemia en los animales infectados por *C. albicans* (ADRIANO y SCHWARZ, 1955).

MacKinnon en 1936 fue el primero en dar a conocer que dentro del género *Candida* no sólo *C. albicans* es patógena, demostrando que *C. tropicalis* actúa como tal cuando es administrada en grandes dosis (HURLEY, 1965).

Fuentes y col., señalaron en 1952 que la rata, conejo, cobayo y ratón son receptibles a *C. albicans*, precisamente en este orden; y al estudiar la enfermedad experimental determinada por vía intravenosa, les llamó la atención los efectos sobre el sistema nervioso central (WINNER y HURLEY, 1964).

Salvin, en 1952, comprobó que los filtrados de suspensiones de *C. albicans* producían las mismas lesiones que los organismos vivos, debido a que éstos poseen una endotoxina soluble (ADRIANO y SCHWARZ, 1955).

ADRIANO y SCHWARZ (1955), HURLEY y WINNER (1963), LOURIA y col. (1963), HURLEY y MORRIS (1964), LOURIA (1965), AINSWORTH y AUSTWICK (1973) y en general todos los autores, algunos de los cuales se citan posteriormente, coinciden en que *C. albicans* es letal para el ratón por vía intravenosa, afectando principalmente a los riñones y en menor grado al corazón, cerebro, etc.

MANKOWSKI (1957) encontró que *C. albicans*, *C. stellatoidea* y *C. tropicalis*, en suspensión salina, eran patógenas para el ratón por vía intravenosa e intracerebral, no siéndolo *C. krusei* y *C. pseudotropicalis*, aunque éstas lo eran en suspensión de mucina por vía intraperitoneal.

HASENCLEVER (1959) observó que el ratón y conejo eran altamente receptibles por vía intravenosa a *C. albicans*, encontrando considerable variación en cuanto a patogenicidad dentro de las diferentes cepas. *C. tropicalis* también daba lugar a cierta letalidad en el ratón y *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* carecían de ella; igualmente señaló la importancia del tamaño del inóculo.

MOURAD y FRIEDMAN (1961) y HURLEY (1966 b), inoculando ratones por varias vías, con *C. albicans*, coinciden en que la intravenosa es la más apropiada para estudios de virulencia.

HASENCLEVER y MITCHELL (1961) encontraron que *C. tropicalis* posee un grado considerable de virulencia para el ratón, pero menor que *C. albicans*. HURLEY y WINNER (1962) también observaron la patogenicidad de *C. tropicalis* por vía intravenosa.

RAMANANDA RAO y SIRSI (1962) comprobaron que incluso fuertes inóculos de *C. albicans* no provocaban infecciones en los ratones por vía oral y vaginal, mientras que por vía intravenosa existía una relación directa entre la dosis y la mortalidad, siendo los órganos más afectados el riñón y cerebro.

HASENCLEVER y MITCHELL (1962) y SOLES y col. (1967), encontraron que ratones pre-inoculados con *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* y otras levaduras, presentaban cierta inmunización cuando posteriormente eran inyectados intravenosamente con dosis letales.

HURLEY y WINNER (1964) se opusieron a algunos autores que afirmaban que la única especie patógena de *Candida* es *C. albicans*, considerando que también lo eran para ratón y conejo, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* y que existían razones para sospechar también de *C. parakrusei* y *C. guilliermondii*.

RAMANANDA RAO y SIRSI (1964) señalaron que intravenosamente en el ratón, *C. albicans* daba una mortalidad del 100 %, *C. tropicalis* del 20 %, mientras que no lo determinaban *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. macedoniensis* y *C. pelliculosa*.

HURLEY (1965) inoculó *C. stellatoidea* al ratón y observó su patogenicidad por vía intravenosa, con lesiones en riñón, cerebro y corazón; no causaba infección por vía intradérmica e intraperitoneal, aunque sí afectaba a los pulmones por vía intrapulmonar.

GOLDSTEIN y col. (1965) comprobaron que *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* no daban lugar a un proceso progresivo en el ratón, siendo eliminadas rápidamente. A su vez afirmaron que la no invasión del riñón, se explicaba por la falta de capacidad para penetrar en los túbulos renales y la ausencia de formación de pseudomicelio en los tejidos.

Varios autores han observado que se puede potenciar el poder patógeno de *C. albicans*. HURLEY (1966 a), HOLM y MARWIN (1967), comprobaron esta potenciación en ratones con fiebre tifoidea o irradiados, ratones inoculados con sustancias activo-superficiales y cobayos pre-inoculados con «calloxxan», respectivamente; asimismo, MANKOWSKI (1957) y SONG (1974), comprobaron este hecho con respecto a varias levaduras, en ratones tratados con cortisona y otras sustancias.

SCHIEFER y MEHNERT (1967) después de inocular *C. albicans*, *C. krusei*, *Cryp. neoformans* y otras levaduras en el ratón, por vía subcutánea, intramuscular e intraperitoneal, comprobaron la producción de inflamación granulomatosa.

SIKDAR y col. (1972) inyectaron ratones intraperitonealmente con *C. pseudotropicalis* procedente de yeguas abortadas, muriendo los ratones en 5-7 días.

WILDFEGER (1972) inoculó en la piel de conejo y ratón, especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y otros, determinando la infección máxima *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *Tor. glabrata* y en menor grado *C. tropicalis* y *C. krusei*. Intravenosamente, fueron patógenas para el ratón varias especies del género *Candida* y otras levaduras.

KNUTSON y col. (1973) inyectando intravenosamente *Torulopsis glabrata* en ratones en gestación de 14 días, observaron que abortaban, produciéndose lesiones en placenta y riñón.

REY y col. (1973) llegaron a la conclusión de que *C. albicans* de origen humano es más patógena que la procedente de leche de abasto, mediante inoculación intravenosa en el ratón.

FERNANDEZ-DIEZ y col. (1974) inocularon intravenosamente al ratón con 11 especies de levaduras, entre ellas *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*, resultando únicamente patógenas *C. albicans* y *C. tropicalis*.

2.1.4. Antifúngicos.

Muchas han sido las sustancias ensayadas contra los hongos, desde que en 1839 Schwann «demuestra que ciertos compuestos químicos son capaces de matar a las levaduras» (JORGENSEN y HANSEN, 1959). Sin embargo, no todos los antifúngicos son aplicables en la clínica humana o veterinaria, ya que, tal como dicen LASKIN y LECHÉVALIER (1973) «entre los 1.000 agentes antifúngicos efectivos «in vitro», pocos tienen actividad «in vivo», estando ésta en relación con la permeabilidad al agente antifúngico, del hongo, y de la célula hospedadora». Por otro lado, los efectos farmacológicos sobre el ser vivo hacen que muchos de ellos carezcan de valor clínico.

Los antifúngicos abarcan un gran número de sustancias, que ET ZEBI (1969), agrupa en:

-preparaciones iodadas, sales de metales pesados, ácidos grasos, derivados fenólicos, sales de amonio cuaternario, benzotiazoles, colorantes difenil-metánicos, antihistamínicos, esteres, antibióticos.

Para nuestros estudios hemos utilizado 15 antifúngicos, seleccionados entre los de uso más común en el mercado internacional y a los cuales nos referiremos seguidamente.

NISTATINA (Fungicidin, Mycostatin) ($C_{46}H_{77}NO_{19}$).

Es un antibiótico polieno (tetraeno) que fue descrito por Hazen y Brown en 1950, derivado de *Streptomyces noursei*, microorganismo encontrado en el suelo de una granja de Virginia. También es producido por *Streptomyces aureus* y otros *Streptomyces*. Se presenta en forma de un polvo amarillo claro, insoluble en agua y soluble en N, N-dimetilformamida, propilenglicol, etc. Activo contra hongos (en especial candidas), careciendo de efecto sobre las bacterias.

HAZEN y BROWN (1951) comunicaron que la nistatina actuaba intracelularmente, resultando de algún valor en el tratamiento de la histoplasmosis y criptococosis experimental del ratón.

DROUHET (1955), señaló que la nistatina tiene acción fungistática y fungicida, sobre varias especies de *Candida*, resultando ser más efectiva en medio líquido que en sólido.

LUTZ y WITZ (1957), comparando la nistatina y tricomicina sobre varias cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*, y CARETTA y FURESZ (1958), frente a varias especies de *Candida* y otras levaduras, encontraron que era superior la tricomicina.

QUINN y col. (1960), GHOSH y GHOSH (1963), DOUPAGNE (1960), NEGRONI (1966), HEJZLAR y VYMOLA (1970) entre otros, comprobaron la acción «in vitro» de la nistatina sobre distintas especies del género *Candida* y otras levaduras.

LITTMAN y col. (1958), intentaron sin resultado inducir resistencia a la nistatina en *C. albicans*, lográndolo no obstante en otras especies de *Candida*. En cambio, Kubista y Derse en 1959, consiguieron inducir resistencia en *C. albicans* después de varios pasos (WINNER y HURLEY, 1964), lo que también consiguieron TEBYAKINA y CHAIKOVSKAYA (1960), que no lo lograron con *C. stellatoidea* y *C. intermedia*. PANIKER y col. (1963), observaron que *C. krusei* era la más resistente entre distintas especies de *Candida* sensibles a la nistatina.

WAWRZKIEWICZ (1973) afirmó que la acción fungistática de la nistatina disminuía por la presencia de suero en el medio de cultivo, y que el solvente del antibiótico también podía influir, aumentando o disminuyendo la acción sobre las cándidas.

PIMARICINA (Natamycin, Tenneccetin, Pimafucin) ($C_{33}H_{47}NO_{13}$).

Es un tetraeno producido por *Streptomyces natalensis*, microorganismo recogido del suelo en África del Sur. Se presenta en forma de un polvo cristalino, blanco, inodoro, insípido. Poco soluble en agua, lo es en disolventes orgánicos.

Fue descrita por STRUYK y col. (1958), comunicando que es muy activa sobre levaduras y hongos filamentosos (*C. albicans*, dermatofitos, etc.), no teniendo acción sobre las bacterias.

Burns y Holtman en 1959, obtuvieron a partir de *Streptomyces chattanoogensis* un nuevo antibiótico, con el mismo espectro que la pimaricina, al que denominaron «tenneccetin», comprobándose posteriormente que era idéntico a la pimaricina (RAAB, 1969).

DROUHET (1965) estudió «in vitro» la pimaricina y afirmó que poseía acción sobre levaduras y hongos filamentosos. NEGRONI (1966) comprobó también la acción «in vitro» sobre *Torulopsis glabrata*.

FEGELE, BIESS y ALTERAS, COJOCARU y WOLKONSKI (1968), comunicaron que las levaduras, particularmente del género *Candida*, tenían una mayor sensibilidad, y que los dermatofitos eran menos receptibles existiendo especies que únicamente eran sensibles a fuertes dosis. RAAB (1969), en una revisión de la pimaricina, coincide con los anteriores autores en cuanto a la acción sobre levaduras y hongos filamentosos.

HEJZLAR y VYMOLA (1970) compararon «in vitro» la acción de la pimaricina y nistatina sobre *Candida* y *Trichophyton*, resultando que la nistatina tenía un poco más de efectividad, pero determinaba la aparición de cepas de *Candida* resistentes, lo que no ocurría con la pimaricina. POREBSKA, LASKOWNICKA y ZEMBRUOWA (1971), también coincidieron en la superioridad de la nistatina «in vitro».

WILDFEIER (1973) señaló que difería su modo de acción de la de otros polienos, ya que estimulaba la formación y posterior lisis de células gigantes entre las células normales.

ANFOTERICINA B ($C_{46}H_{73}NO_{20}$)

Antibiótico polieno (heptaeno), producido por el *Streptomyces* M4575 que fue aislado del suelo en la zona del río Orinoco (Venezuela), denominándose posteriormente *Str. nodosus*. Se presenta en forma de cristales prismáticos de intenso color amarillo. Es insoluble en agua y ligeramente soluble en propilenoglicol, N,N-dimetilformamida...

GOLD y col. (1955-56) aislaron la anfotericina A y B a partir de cultivos del *Streptomyces* M4575, siendo «in vitro» la anfotericina B más activa contra las levaduras que la anfotericina A, pero presentando esta última un espectro más amplio.

HALDE y col. (1957) encontraron que «in vitro» la anfotericina B inhibía el crecimiento de muchos hongos productores de micosis sistémicas y observaron que también producía mejoramiento en las candidosis y coccidioidomicosis del ratón.

LONES y PEACOCK (1959), después de cultivos sucesivos de *C. albicans* en medios con

anfotericina B, comprobaron que se desarrollaba una cierta resistencia a este antibiótico, a la vez que algunas alteraciones morfológicas.

GHOSH y GHOSH (1963), afirmaron que sobre *C. albicans* la anfotericina B era más efectiva que la nistatina.

MARKS, STEER y EICKHOFF (1971) encontraron que la anfotericina B era más efectiva «in vitro» que la 5-fluorocitosina y el clotrimazol, sobre *Tor. glabrata*. Similares resultados obtuvo HAMILTON-MILLER (1972) sobre *Tor. glabrata* y otras especies del género *Candida*.

MEDOFF, COMFORT y KOBAYASHI (1971) observaron que la asociación de anfotericina B y 5-fluorocitosina «in vitro» producía efectos sinérgicos sobre diversas levaduras, entre otras *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

PREAC-MURSIC (1972), no encontró diferencias en cuanto al efecto de anfotericina B, clotrimazol y nistatina sobre varias especies de *Candida* ensayadas por el método de difusión en agar.

HOWARTH y col. (1975) citan que Mechlinski y Schaffner prepararon en 1972 la anfotericina B metil éster, que era soluble en agua y menos tóxica que la anfotericina B; asimismo, compararon la actividad antifúngica «in vitro» de ambas anfotericinas sobre varios hongos patógenos o potencialmente patógenos, observando que la actividad de la primera era ligeramente más baja.

TRICOMICINA (Cabimicina, Hachimicina)

Antibiótico polieno (heptaeno) aislado en la Universidad de Tokio en 1952 a partir del *Streptomyces hachijoensis*, microorganismo encontrado en el suelo de la isla Hachijo Jima, en el Pacífico. Se presenta en forma de cristales amarillos, solubles en agua.

MAGARA y col. (1954) afirmaron que la tricomicina tenía fuerte acción «in vitro» sobre *C. albicans*, *Trichomonas vaginalis* y bacterias anaerobias. HOSOYA y col. (1955), LACAZ y ULSON (1958) y TSYGANOV y col. (1964) comprobaron que inhibía el crecimiento de *C. albicans*, *Candida* spp. y *Trichophyton mentagrophytes*.

LUTZ y WITZ (1957), CARETTA y FURESZ (1958) y LAMBOTTE (1960) coincidieron en señalar que la tricomicina era superior a la nistatina en cuanto a su acción inhibitoria «in vitro» sobre cándidas y otras levaduras, actuando además sobre *Trichomonas vaginalis*.

SEIGA y col. (1973) compararon la acción de la tricomicina y pimaricina sobre *C. albicans* y *T. glabrata*, encontrando un superior efecto por parte de la tricomicina.

HAMICINA

Antibiótico polieno (heptaeno) producido por *Streptomyces pimprina*, descubierto y estudiado por THIRUMALACHAR y col. (1961). Se presenta en forma de un polvo amarillo, soluble en piridina, dimetilformamida, etc., y prácticamente insoluble en agua.

RAMANANDA RAO y SHRI (1964) encontraron que la hamicina era más potente «in vitro» que la nistatina, pimaricina y anfotericina B sobre varias cándidas.

THIRUMALACHAR y PADHYE (1965) observaron que la hamicina inhibe «in vitro» el desarrollo de *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, siendo 10-50 veces más activa que la anfotericina B.

MANIAR (1966) realizó estudios «in vivo» e «in vitro», encontrando que la hamicina y el aureofungin eran dentro de los 11 polienos investigados los más activos («in vitro») sobre *C. albicans*.

ATHAR (1971) encontró que varias especies de *Candida* eran sensibles a la hamicina y consiguió inducir resistencia a la misma en cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*. SHADOMY (1971 a), señaló que era activa «in vitro» sobre la mayoría de los hongos sistémicos, pero que «in vivo» y en el ratón, presentaba menor actividad, no siendo efectiva en casos de criptococosis e histoplasmosis, pero sí en blastomicosis.

THIRUMALACHAR y col. (1972) afirmaron que la actividad «in vitro» de la hamicina estaba relacionada con la solubilidad del antibiótico, apreciando también que a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento disminuía su acción «in vitro» sobre *C. albicans*, mientras que «in vivo» y después de 5 años apenas variaba su acción contra *Cryptococcus neoformans* en los animales.

PANSE y NARAYAN (1973), sobre varias *Candida* spp. aisladas de enfermos, encontraron que la hamicina era más efectiva «in vitro» que la nistatina, anfotericina B y tricomicina.

AUREOFUNGIN

Antibiótico heptaeno producido por *Streptoverticillium cinnamomeum* var. *terricolum*, microorganismo hallado en el suelo en Pimpri (India). Se encuentra en forma de polvo amarillo-oro, insoluble en agua, soluble en alcohol, dimetilformamida, etc. Actúa contra un gran número de hongos fitopatógenos, y *C. albicans* y *Asp. fumigatus* entre otros hongos zoopatógenos.

Los primeros estudios fueron realizados por Thirumalachar y Bhate en 1962, según THIRUMALACHAR y col. (1964) los cuales encontraron que «in vitro» resultaba muy activo sobre levaduras (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*) y que los dermatofitos eran algo menos sensibles. Comparado con la tricomicina, tenía mayor actividad sobre *C. albicans*, *A. fumigatus* y *Trich rubrum*.

PIRROLNITRIN ($C_{10}H_6O_2N_2Cl_2$)

Se presenta en forma de cristales amarillo pálidos, muy ligeramente solubles en agua y bastante solubles en acetona, éter y cloroformo.

ARIMA y col. (1965) descubrieron este antibiótico, producido por una bacteria aislada del suelo en la Prefectura de Chiba (Japón). IMANAKA y col. (1965) identificaron esta bacteria como una especie nueva, denominándola *Pseudomonas pyrrocinia*.

NISHIDA y col. (1965) señalaron que «in vitro» actuaba principalmente sobre dermatofitos y *Penicillium* spp., siendo algo menos sensibles *C. albicans* y ciertas bacterias Gram positivas.

GORDEE y MATTHEWS (1967) afirmaron que presentaba acción «in vitro» sobre dermatofitos y *C. albicans* y resultaba efectivo en el tratamiento de las micosis superficiales. Posteriormente GORDEE y MATTHEWS (1969) comprobaron la inhibición «in vitro» de algunos hongos patógenos (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*), pero con una limitada actividad como antifúngico sistémico, resultando menos efectivo que la anfotericina B, hamicina, 5-fluorocitosina y saramicetina.

NOSE y ARIMA (1969) concluyeron que la principal acción del pirrolnitrín es atacar la membrana celular, a través de su combinación con los fosfolípidos, en lo que estuvieron de acuerdo CARLONE y SCANNERINI (1974). TRIPATHI y GOTTLIEB (1969) afirmaron que actuaba inhibiendo el sistema respiratorio del hongo.

LU (1971) confirmó la acción «in vitro» sobre dermatofitos y penicilios, resultando *C. albicans* y *Candida* spp. bastante menos sensibles.

GRISEOFULVINA ($C_{17}H_{17}ClO_6$)

Antibiótico producido por *Penicillium griseofulvum*, insoluble en agua, pero soluble en acetona y etanol.

BLANK y ROTH (1959) señalaron que la griseofulvina inhibía distintos dermatofitos, pero que *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* eran resistentes a concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. ROTH, SALLMAN y BLANK (1959) observaron que actuaba «in vitro» sobre dermatofitos, mientras que diferentes levaduras no patógenas eran resistentes a altas concentraciones.

O'GRADY, THOMPSON y COTTON (1963) apuntaron que la griseofulvina produjo mejoramiento de una lesión muscular por *C. albicans*, pero que carecía de efecto sobre esta especie «in vitro». WINNER y HURLEY (1964) comunicaron que la griseofulvina no afectaba «in vitro» a las cándidas y que carecía de acción en el tratamiento de las candidosis; no obstante citan a Andrews y col., quienes observaron un mejoramiento de las dermatomicosis por cándidas.

NEGRONI (1966) demostró la carencia de efectos inhibitorios sobre *T. glabrata* y *C. albicans*.

SHADOMY (1971 b), FRAGNER (1972), YOUNG (1972), etc., estudian la acción de la griseofulvina sobre los dermatofitos.

CICLOHEXIMIDA (Actidiona) ($C_{15}H_{23}NO_4$)

Es producida por cepas de *Streptomyces griseus* y fue aislada en los Laboratorios Upjohn.

Muy activa contra numerosas levaduras y hongos filamentosos, es tolerada en altas concentraciones por la mayor parte de las bacterias, por lo que se emplea para añadir a los medios de cultivo, impidiendo el crecimiento de ciertos hongos de contaminación.

LEACH, FORD y WHIFFEN (1947) fueron los primeros en estudiar la actidiona, comunicando que carecía o tenía poca actividad contra las bacterias y que era fuertemente inhibidora de muchas

levaduras, entre ellas *Cryptococcus neoformans*. Según SALKIN y HURD (1971), Whiffen en 1948-50 estudió el poder antifúngico de la cicloheximida, encontrando que los hongos zoopatógenos eran 10-15 veces más resistentes a este antibiótico que los fitopatógenos o saprofitos. KLEIN y ORR (1962) indican que Phillips y Hanel en 1950, emplearon la actidiona para eliminar los hongos contaminantes de medios bacteriológicos y que Georg, Ajello y Gordon en 1951 demostraron el valor de la actidiona como agente selectivo para el aislamiento de *Coccidioides immitis*.

NEGRONI (1966) observó que la actidiona presentaba mayor poder inhibidor sobre *T. glabrata* que la nistatina, anfotericina B y pimaricina; y que *C. albicans* y otras cándidas no eran afectadas por concentraciones de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

FRIEDRICH y BOHME (1974) cultivaron levaduras en medios con 400-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de cicloheximida y observaron que no se reducía el crecimiento de *C. albicans*, *C. pseudotropicalis* y otras especies, mientras que *C. krusei* y *Cryptococcus neoformans* eran fuerte o completamente inhibidos y *Pichia membranafaciens* y otras levaduras presentaban variaciones en la sensibilidad.

ECTIMAR (Bay Va 5387) ($C_9H_{10}N_2S \cdot HCl$)

Es una sustancia incolora, cristalina, poco soluble en agua y soluble en dimetilsulfóxido y etanol.

PLEMPEL y BOSHAGEN (1968) estudiaron este compuesto sintetizado en la Bayer y observaron su acción antimicótica «in vitro» y «in vivo»; los dermatofitos (*Trichophyton*, *Microsporum*) fueron los más afectados, actuando también sobre mohos y *C. albicans*.

RIET (1971) comprobó que el ectimar «in vitro», a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, era efectivo en un 100 % contra el hongo productor del «amarillo infeccioso» de la lana.

CLOTRIMAZOL (Bay b 5097) ($C_{22}H_{17}ClN_2$)

Sintetizado en los laboratorios de la fábrica Bayer AG, es una sustancia cristalina, incolora, prácticamente insoluble en agua, pero soluble en acetona, dimetilformamida, cloroformo.

PLEMPEL y col. (1969) realizaron los primeros estudios, encontrando que tiene acción «in vitro» e «in vivo» sobre *Candida*, *Cryptococcus* y otras levaduras, dermatofitos, mohos, etc.; después de realizar varios pases con algunos de ellos, no comprobaron el desarrollo de resistencia.

WEHRSPANN (1971) estudió la sensibilidad «in vitro» de 287 levaduras (*Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*) frente al clotrimazol, resultando ser las más resistentes *C. tropicalis* y *Torulopsis* spp. BODENHOFF (1971), trabajando con *Candida* spp., *T. glabrata* y *Cryptococcus neoformans*, encontró que la sensibilidad al clotrimazol variaba bastante entre las distintas cepas de la misma especie, siendo algo resistentes *C. tropicalis* y bastantes *C. albicans*.

SHADOMY (1971 b) encontró que la actividad inhibitoria «in vitro» sobre hongos sistémicos era similar a la de la anfotericina B; sobre *C. albicans* y *A. fumigatus* era menos activa que ésta, y sobre dermatofitos resultó comparable al pirrolnitrín y superior a la griseofulvina y nistatina.

Otros autores, WAITZ y col. (1971), MAHGOUB (1972), BURGESS y BODEY (1972), HOLT y NEWMAN (1972), RITZERFELD y WEISBROD (1972), PLEMPEL y BARTMANN (1972), CLAYTON y CONNOR (1973), CHO y col. (1974), etc., estudiaron su acción, «in vitro» sobre levaduras (*Candida*, *Torulopsis*, etc.), dermatofitos y otros hongos⁸⁷.

IWATA, YAMAGUCHI y HIRATANI (1973) comprobaron el modo de actuación del clotrimazol sobre *C. albicans* y afirmaron que afectaba principalmente a la membrana celular, dañando la permeabilidad de la misma.

MICONAZOL

Sintetizado en los Laboratorios «Janssen Pharmaceutica» (Bélgica), es un derivado del 1-fenil imidazol. Polvo blanco, microcristalino, escasamente soluble en agua.

GODEFROI y col. (1969) comprobaron que los derivados del 1-fenil imidazol tenían propiedades antimicóticas, siendo bastante activos contra los dermatofitos y algunos también sobre *C. albicans*. Posteriormente VAN CUTSEM y THIENPONT (1972) y REFAI (1973) vieron igualmente su acción «in vitro» sobre dermatofitos, levaduras, otros hongos y algunas bacterias Gram positivas.

GRUPPER y AVRAM (1974) afirmaron que el miconazol es superior a la pimaricina y anfotericina B contra *C. albicans*, y de acción comparable a la nistatina; sobre los dermatofitos, resultó superior al tolnaftato y pimaricina y comparable a la griseofulvina.

SREEDHARA SAMY, SIRSI y RAMANANDA RAO (1974), comprobaron su potente acción inhibitoria sobre el crecimiento «in vitro» de *Candida* spp y al igual que NOLLIN y BORGERS (1974), señalaron su acción sobre la membrana celular.

VAN DEN BOSSCHE y col. (1975) estudiaron la forma de actuación del miconazol en el crecimiento de *C. albicans*.

5-FLUOROCITOSINA

Es una fluoro-pirimidina que actúa como antimetabolito de la citosina en los hongos sensibles a su acción, pero que no afecta a la citosina de las células animales. Es un sólido cristalino, inodoro y soluble en agua.

SHADOMY (1969) describió procedimientos para el estudio de la actividad de la 5-fluorocitosina tanto en medios líquidos como sólidos y señaló que los medios empleados comúnmente para el estudio «in vitro» de los antifúngicos no son apropiados para la 5-fluorocitosina, recomendando «Yeast Nitrogen Base». Posteriormente (SHADOMY, 1970), sobre levaduras aisladas de enfermos, observó que el tratamiento con 5-fluorocitosina favorecía la presentación «in vitro» de cepas resistentes de *Cryptococcus neoformans*, mientras que con *C. albicans* y *Candida* spp. no se observaba este fenómeno.

SCHOLER (1970) comunicó que la 5-fluorocitosina actuaba «in vitro» sobre las levaduras, aspergilos y dematiáceas, principalmente.

HERRELL (1971), citando a otros autores, afirma que la 5-fluorocitosina da excelentes resultados en el tratamiento de las criptococosis y candidosis sistémicas del hombre.

HAMILTON-MILLER (1972) y LÓPEZ GRACIA (1972) MARKS y col. (1971), SHADOMY (1971 a), comprobaron que posee una notable acción antifúngica «in vitro» frente a *Candida*, *T. glabrata*, *C. neoformans* y otras levaduras.

NORMARK y SCHONEBECK (1972), observaron que en *C. albicans*, la frecuencia de mutaciones espontáneas de cepas sensibles a resistentes, es bastante alta. SCHONEBECK y ANSEHN (1973) encontraron en pacientes no tratados, cepas de *Candida* spp. y *T. glabrata* resistentes a la 5-fluorocitosina; dicha resistencia fue aún más común en las levaduras aisladas de enfermos tratados con 5-fluorocitosina, sobre todo cuando la dosis había sido baja. SHADOMY y col. (1973) estudiaron la receptibilidad de varias especies de *Candida*, siendo *C. parapsilosis* la más resistente «in vitro».

SHADOMY y col. (1975) observaron que asociando 5-fluorocitosina con concentraciones subinhibitorias de anfotericina B, se producía un sinergismo de la actividad antifúngica, disminuyendo la C. M. I y la C.M.F. de la 5-fluorocitosina, frente a algunas de las cepas estudiadas (*Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*).

TOLNAFTATO ($C_{19}H_{17}NO$)

Pertenece a los compuestos químicos llamados «nastiomatos». Es un compuesto incoloro, inodoro, muy soluble en solventes orgánicos (polietilenglicol) y casi insoluble en agua.

WEINSTEIN, ODEN y MOSS (1964) dicen que fueron Noguchi y col. en 1962 los primeros en citar al tolnaftato, y a su vez confirmaron su actividad antifúngica «in vitro» contra dermatofitos y su inactividad sobre *C. albicans* y otros hongos filamentosos; compararon también su actividad «in vivo» con la de otros antifúngicos y desarrollaron un nuevo procedimiento para ensayo microbiológico del tolnaftato.

ROBINSON (1964), JASKOSKI y THOMPSON (1967) y GRACIA JOVER y col. (1967), comprobaron también la actividad «in vitro» del tolnaftato sobre *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* y su falta de acción sobre *C. albicans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *P. notatum*, etc.

WATZ, MOSS y WEINSTEIN (1971) observaron que el tolnaftato era más activo «in vitro» contra los dermatofitos que el clotrimazol y la griseofulvina.

BRADOSOL ($C_{22}H_{40}BrNO$) (PDDB)

Es una sal de amonio cuaternario, que forma un compuesto cristalino, blanco, soluble en agua.

KUTSCHER y col. (1954), en estudios de dilución en tubo, encontraron que inhibía el crecimiento de 18 cepas de *C. albicans*, en concentraciones entre 1/48.000 y 1/192.000. Posteriormente

(KUTSCHER y col., 1956) comprobaron que la concentración usada clínicamente (0,01 %) era capaz de matar dichas cepas de *C. albicans* en 5-10 minutos.

KULL y col. (1961) señalaron que la adición de ácido undecilénico en la proporción de 0,13-1 mg/100 ml, acrecentaba la acción fungistática del bradosol sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *C. albicans*.

2.2. MATERIAL Y METODOS

2.2.1. Recogida de muestras.

La técnica de toma de muestras empleada por los distintos autores no difiere grandemente, lo mismo si es en los animales como si se trata del hombre. Unas veces es realizada en animales vivos (HAJSIG y SETINSKI, 1963; BISPING, 1963; KRABISCH, 1971; AL-DOORY y col., 1967; MORENO y col., 1973) y otras tras el sacrificio (SÁEZ, 1965; MALICKA, 1969; HAJSIG y col., 1974) previa resección de los órganos. Tanto la vagina, como el cuello y útero, son empleados indistintamente para la recogida, que se realiza por medio de hisopos, torundas, e incluso con la pipeta de Frank modificada (HILLMAN, 1969). En muchos casos se hace previamente la desinfección de la zona vulvar y la introducción de un espéculo (FREITAS y col., 1960-62).

Los hisopos, normalmente constituidos por un estilete metálico (LACERDA y col., 1954; NUNN, 1970) o una espátula de madera (MANERO, 1972), o algo similar, llevan en un extremo una torunda seca de algodón o gasa y se mantienen en tubos de vidrio (LACERDA y col., 1954; FREITAS y col., 1960-62) o de plástico (KRABISCH, 1971), cerrados con algodón o rosca, esterilizando todo el conjunto en calor seco (LACERDA y col., 1954) (180°C, 2 horas) o en calor húmedo (MANERO, 1972) (1 atmósfera, 15 minutos).

Para la toma de la muestra, una vez introducido el hisopo en el aparato genital, algunos autores favorecen la impregnación rotándolo en su interior (AL-DOORY, 1967), mientras que otros lo dejan introducido durante 1-2 minutos (MORENO y col., 1973), e incluso algunos realizan un masaje del útero por vía rectal con el fin de provocar la salida de flujo por el cuello uterino (LACERDA y col., 1954).

Los tubos portadores del hisopo pueden contener caldo Sabouraud (DAWKINS y col., 1953; GONZÁLEZ-OCHOA y GARCÍA RAMOS, 1963), agua destilada (HALDE y ARAGON, 1956), o suero de ternera (AL-DOORY y col., 1967), con el fin de evitar la desecación de la muestra antes de realizar la siembra. Algunos autores durante este tiempo y por la misma razón los mantienen refrigerados (KRABISCH, 1971) o en el congelador (AL-DOORY, 1967).

2.2.2. Aislamiento de cepas

2.2.2.1. Medio y técnica de siembra

En el aislamiento, el medio más comúnmente empleado es el agar glucosado de Sabouraud (TURNER, 1965; MALICKA, 1969; MORENO y col., 1973), al que se suele añadir antibióticos como la penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, con el fin de evitar el crecimiento bacteriano.

La temperatura y tiempo de incubación más empleados son 37°C y 2-4 días, aunque según los diferentes autores estos valores fluctúan entre 25-30-37°C y 2-7-28 días.

También se ha usado el agar de Kimmig junto con los antibióticos citados (BISPING, 1963; KRABISCH, 1971), así como un medio inicial a base de mosto de cerveza, para enriquecimiento de la muestra, antes de sembrar en el agar de Kimmig (KRABISCH, 1971). Otros medios empleados han sido el agar malta (MANERO, 1972), agar sangre-infusión-cerebro-corazón (AL-DOORY y col., 1967) caldo glucosado (MORENO y col., 1973), medio de Nickerson (SIMONE, 1966; DAVIS, 1969), Pagano Levin (GILLESPIE y col., 1960; SIMONE, 1966), agar miel Sabouraud (APARICIO GARRIDO, 1959), etc.

La siembra sobre estos medios ha consistido en un simple rayado o extensión con el hisopo-torunda sobre la superficie del agar.

2.2.2.2. Tipificación.

En la identificación de las levaduras, la mayoría de los autores siguen las pautas dadas por LODDER y KREGER-VAN RIJ (1967) y LODDER (1970) que a su vez han realizado un trabajo exhaustivo.

tivo, recogiendo todo lo relacionado con el tema hasta entonces. LODDER (1970) basó la identificación en el estudio de las características morfológicas, de cultivo, sexuales y fisiológicas.

A. Características morfológicas.

Reproducción vegetativa, forma y tamaño de las células; que son estudiadas tanto en medios líquidos como sólidos, siendo los más comunes, extracto de malta, agar malta, glucosa 2 % extracto levadura-agua de peptona, agar glucosa 2 %-extracto levadura-peptona, «morphology agar».

Pseudomicelio y verdadero micelio; que puede observarse por medio de cultivos en porta o por la técnica en placa de Dalmau, empleando como medios «corn meal agar», agar glucosa patata, «morphology agar».

Clamidosporas; para su obtención se siembra en el fondo de la placa o en una capa intermedia (en boquillo), empleándose diversos medios; MÁNERO (1972), recopila el medio de Taschdjian + Tween 80 al 1 %, «corn meal agar + Tween 80 al 1 %», agar Czapek-Dox, medio de Nickerson, medios de Skinner y Fletcher, de Drouhet, de Negroni-Dagli.

Endosporas y ballistosporas; que sirven de ayuda en la clasificación de determinados géneros, empleándose medios como «corn meal agar», agar glucosa patata.

B. Características culturales.

La formación de sedimento, anillo y película, así como las características de las colonias, son observadas en medios líquidos y sólidos, sirviendo los mismos que se emplean en el estudio de la forma y tamaño de las células.

C. Características sexuales.

Formación de ascosporas; se determina primero un estado de crecimiento activo por medio del cultivo directo en agar malta, Y M agar, o en medios de presporulación como el de Lindgren, el «grape juice». Posteriormente se realiza la esporulación en medios como agar Gorodkowa, «vegetable wedges», «gypsum blocks and wedges», agar acetato de Fowell, de Kleyn, de Mc Clary, «M E agar», «corn meal agar», «Y M agar», etc.

Para la tinción de esporas se han empleado, entre otros, los métodos de Wirtz, Wirtz modificado por Schaeffer-Fulton, fuchina fenicada modificación de Kufferath, Gray, Mc Clung y otros.

La infertilidad de los ascomicetos y las características de teliosporas y «sporidia», son también usadas en la clasificación de las levaduras.

D. Características fisiológicas.

Utilización fermentativa de los compuestos carbonados; la fermentación de los azúcares suele realizarse en tubos, a los que se incorporan tubos Durham, utilizándose el azúcar al 2 % (rafinosa 4 %) en medios como «yeast autolysate», «yeast infusion», «fermentation basal medium»; DROUET y MILLE COUTEAU (1954), emplean agua peptona de Andrade.

Utilización oxidativa o asimilación de los compuestos carbonatados; puede tener lugar en medio líquido («bacto yeast nitrogen base», «stock vitamin solution», «inoculation medium») y en medio sólido (con agar lavado y un medio basal nitrogenado), o por el método auxonográfico, en el que se pueden utilizar simultáneamente varios compuestos carbonados.

Desdoblamiento de la arbutina; también se emplea y confirma la actividad de la beta-glucosidasa.

Utilización de compuestos nitrogenados; en que la asimilación de nitratos, nitrítos, aminoácidos, creatina, etc., puede realizarse en medio líquido («bacto yeast carbon base») o por el método auxonográfico.

El crecimiento en medio libre de vitaminas, en medios de alta presión osmótica, a elevadas temperaturas, producción de ácido, hidrólisis de la urea, etc., son también características fisiológicas que se emplean en la tipificación de las levaduras.

Independientemente de las pruebas generales reseñadas, existen otras que se utilizan para la clasificación rápida de las levaduras, entre las que se pueden citar la producción de tubos germinales para *C. albicans* (MACKENZIE, 1962), (ALTERAS y GAVILESCO, 1966) y la observación con tinta china de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*.

2.2.3. Patogenia experimental en ratón.

2.2.3.1. Preparación de las suspensiones celulares.

Para la obtención del inóculo se ha partido tanto de medios líquidos como sólidos, predominando quizás éstos últimos. Normalmente se han empleado cultivos de una noche o 24-48 horas, a 30-37°C, en agar Sabouraud dextrosa (ADRIANO y SCHWARZ, 1955; SCHIEFER y MEHNERT, 1967), agar Sabouraud modificado (HASENCLEVER, 1959), caldo Sabouraud glucosa (RAMANANDA RAO y SIRSI, 1962; HOLM y MARWIN, 1967), agar glucosa peptona (HURLEY y WINNER, 1962), agar maltosa peptona (HURLEY y WINNER, 1964), agar malta (REY y col., 1973; FERNÁNDEZ-DÍEZ y col., 1974), caldo casamino-yeast extract-glucosa (MANKOWSKI, 1957; MOURAD y FRIEDMAN, 1961), caldo glucosa (BICHEL y STENDERUP, 1955).

En los cultivos a partir de caldo, el inóculo se suele obtener por centrifugación recogiendo el sedimento y lavándolo repetidas veces con solución salina. La suspensión final a inocular es preparada invariablemente por los distintos autores diluyendo el inóculo en solución salina fisiológica (HURLEY y WINNER, 1962).

2.2.3.2. Dosis y técnica de inoculación

Se emplean ratones blancos, tanto hembras como machos, de unas 6-8 semanas y entre 17-20 g de peso (BICHEL y STENDERUP, 1955; HASENCLEVER, 1959; LOURIA y col., 1963; REY y col., 1973).

En la inoculación experimental se han usado las vías intravenosa, intraperitoneal, intrapulmonar, intradérmica, intracerebral, intranasal y peroral, pero la más efectiva y más común ha sido la intravenosa (MOURAD y FRIEDMAN, 1961; HURLEY, 1966 b).

Se han realizado asimismo inoculaciones en ratones tratados con esteroides, antibióticos (MANKOWSKI, 1957; GOLDSTEIN y col., 1965), o modificados por la fiebre tifoidea o irradiados (HURLEY, 1966 a), lo que hace variar la patogenicidad de las levaduras, aumentándola o disminuyéndola. También la suspensión del inóculo en mucina al 5 % (MANKOWSKI, 1957) u otros vehículos, puede trastocar los resultados.

Para la vía intravenosa se utilizan esencialmente las venas de la cola, pudiéndose anestesiar ligeramente al ratón con cloroformo antes de la inoculación (ADRIANO y SCHWARZ, 1955).

Se suele inyectar 0.1 ml (MOURAD y FRIEDMAN, 1961; RAMANANDA RAO y SIRSI, 1962) o 0.2 ml (HASENCLEVER, 1959; HURLEY y WINNER, 1962) de suspensión de levaduras, o incluso 0.5 ml (LOURIA y col., 1963; GOLDSTEIN y col., 1965), oscilando su número entre 10^2 - 10^3 a 10^7 - 10^8 . El recuento de las levaduras se suele realizar en hematímetros como los de Levy-Hauser (MANKOWSKI, 1957), Levy (HASENCLEVER, 1959; HASENCLEVER y MITCHELL, 1961), Neubauer-Levy (GOLDSTEIN y col., 1965), Neubauer (REY y col., 1973; FERNÁNDEZ-DÍEZ y col., 1974); también por nefelometría, comparando con el tubo 3 de la escala de Mc Farland (ADRIANO y SCHWARZ, 1955) y mediante el recuento de colonias (HOLM y MARWIN, 1967) por sucesivas diluciones en placa.

2.2.3.3. Examen «post-mortem».

De acuerdo con el tipo de experiencia, se ha dejado que los ratones mueran como consecuencia del efecto patógeno de las levaduras o se ha efectuado su sacrificio en distintos intervalos de tiempo, con el fin de observar las alteraciones producidas; el momento del sacrificio ha variado desde unas horas después de la inoculación, a varias semanas o meses, llevándose a cabo por desnucamiento (REY y col., 1973; FERNÁNDEZ-DÍEZ y col., 1974), por inhalación de éter (LOURIA y col., 1963; GOLDSTEIN y col., 1965) o de una mezcla de cloroformo y éter (HURLEY y WINNER, 1962). Posteriormente se realiza la necropsia, con observación macro y microscópica de los órganos. Muchos autores siembran a partir de los diferentes órganos, procediendo a identificar las levaduras aisladas por distintas pruebas e incluso por inoculación en conejo. Para la fijación de órganos se ha utilizado formaldehido 4 % y líquido de Zenker, entre otros, realizándose luego cortes y tinciones principalmente por los métodos de hematoxilina-eosina y ácido periódico de Schiff (HURLEY y WINNER, 1962; LOURIA y col., 1963).

2.2.4. Sensibilidad a distintos antifúngicos.

La sensibilidad de las levaduras frente a los antifúngicos, al igual que la de las bacterias

frente a los agentes antimicrobianos, puede ser estudiada por métodos de dilución (ya sea en medio líquido o sólido) y por métodos de difusión (cilindros, discos de papel, pocillos).

Métodos de dilución: son los de práctica más usual, teniendo como fundamento la mezcla homogénea del medio de cultivo y el antifúngico.

El «Método de las diluciones seriadas», se basa en la preparación de un determinado número de tubos, placas o matraces, en los que el antifúngico se mezcla con el medio de cultivo en unas concentraciones determinadas, que siguen una correlación matemática (2 a 2, 4 a 4, por ejemplo). Este método se lleva a cabo preferentemente en tubos con medio líquido, que es el sistema más empleado en los ensayos con levaduras. También es común el uso de medio sólidos de agar, tanto en tubos como en placas de Petri, que una vez fundidos y llevados a una temperatura de 40-50°C son mezclados con el antifúngico. GOLVAN y DROUHET (1972) afirmaron que en los medios de agar suelen obtenerse C. M. I. más altas que en los medios líquidos.

Métodos de difusión: poco empleados con las levaduras, se fundamentan en la difusión del antifúngico sobre el medio sólido, generalmente agar.

«Métodos de difusión por discos», en que tomando como sustrato un medio de agar, se siembra la superficie por mediación de un hisopo previamente empapado en la suspensión de las levaduras. Posteriormente se colocan los discos de papel impregnados con una cantidad determinada de antifúngico. Se incuba a 37°C durante 24-28 horas y se miden los diámetros de la zona de inhibición (SCHONEBECK y ANSEHN, 1973).

También han sido algo usados los sistemas de difusión por «cilindros metálicos inoxidables» (CARLSON y SNYDER, 1959) y por «pocillos» realizados en el agar (GHOSH y GHOSH, 1963). En ambos, se puede mezclar el agar con el inóculo de levaduras. La solución del antifúngico se depositará en cilindros o pocillos, desde donde poco a poco se difundirá al medio. Finalmente se miden los diámetros de la zona de inhibición.

Micro-métodos: se han usado también métodos reducidos o micrométodos que suponen un ahorro de material, medios de cultivo, etc. Entre ellos, podemos citar el «método de tubos pequeños» de CATALFOMO y SCHULTZ (1966), que emplean tubos de rosca de 17 x 60 mm, con 0.5 ml de agar Sabouraud dextrosa, en cuya superficie se ponen dos gotas de la solución del antifúngico y una vez secas una gota del inóculo de levaduras.

La «micro-dilución en caldo», que utiliza un volumen de 0,1 ml (MARKS y EICKHOFF, 1970).

2.2.4.1. *Medios de cultivo.*

El caldo y agar glucosado de Sabouraud son los más comunes (PADHYE, 1969; ATHAR, 1971; BODENHOFF, 1971; WILDFEUE, 1973).

También se han usado, entre otros, caldo y agar yeast nitrogen base-L asparagina-dextrosa (SHADOMY, 1969; MARKS y EICKHOFF, 1970), yeast morphology agar (SCHOLER, 1970; SCHONEBECK y ANSEHN, 1973), agar de Kimmig (WEHRSPANN, 1971), extracto de levadura (NISHIDA y col., 1965), caldo y agar Sabouraud modificación de Emmons (GORDEE y MATHEWS, 1969), Penassay base agar (GORDEE y MATHEWS, 1967; HAMILTON-MILLER, 1972), caldo asparagina sintética (HALDE y col., 1957), caldo de agua carne-glucosa (PLEMPPEL y BOSHAGEN, 1968), caldo infusión cerebro-corazón (KUTSCHER y col., 1954), agar Sabouraud maltosa (HEJZLAR y VYMOLA, 1970), medio de Kurung (GOLVAN y DROUHET, 1972), etc. Los volúmenes manejados suelen ser de 5-10 ml en tubos y 20-25 ml en medios sólidos en placa.

2.2.4.2. *Antifúngicos y preparación de las diluciones.*

Para los antifúngicos insolubles en agua se han empleado una gran variedad de solventes, siendo los más comunes la dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol y acetona. Una vez disuelto el antifúngico, casi siempre suele incorporarse agua destilada estéril hasta una concentración determinada.

Según GOLVAN y DROUHET (1972), la dimetilformamida es el mejor solvente para los polienos. Muchos autores preparan soluciones «stock», que mantienen por debajo de cero grados hasta el momento de su uso y que suelen tener una concentración de 1 a 10 mg de antifúngico por mililitro de solvente. A partir de ellas y por sucesivas diluciones, normalmente de 2 en 2, en agua destilada estéril, se preparan las diluciones adecuadas para añadir al medio de cultivo. La escala de

concentraciones finales del antifúngico en el medio de cultivo suele estar comprendida entre 0.5-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio, aunque alcanza en muchos casos de 0.001 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e incluso más.

Se preparan también tubos control, con el disolvente y sin antifúngico, en la misma proporción que en el resto, con el fin de estudiar su posible acción inhibidora sobre las levaduras ensayadas.

2.2.4.3. *Preparación de los inóculos.*

Los inóculos de levaduras son preparados corrientemente a partir de cultivos recientes en agar Sabouraud de 24-48 horas, a 30-37°C. Suelen realizarse suspensiones en solución salina fisiológica o agua destilada estéril, con unas concentraciones de 10⁵-10⁶ levaduras/ml, haciendo los recuentos con hematímetros. También se recurre a lograr suspensiones que se miden con espectrofotómetros (una determinada transmisión de luz a una determinada longitud de onda), o se comparan con la escala de Mc Farland.

La siembra se realiza añadiendo al cultivo líquido o sólido unas gotas de la suspensión de levaduras, o pequeñas cantidades que oscilan de 0.05-0.5 ml. El número de levaduras sembradas suele estar incluido más o menos entre 100 (SCHONEBECK y ANSEHN, 1973) a 20.000/ml de cultivo (ATHAR, 1971).

Las placas con medios sólidos presentan la ventaja de poder ser inoculadas con 4-8 levaduras diferentes (GOLD y col., 1955-56; BETINA y col., 1965), para lo cual se realizan unas siembras en estria en diferentes puntos de la superficie. HAMILTON-MILLER (1972) ha llegado a estudiar 23 levaduras en una placa, para lo cual depositó 13 gotas formando un anillo exterior, 8 en un anillo interior y 2 en el centro.

2.2.4.4. *Lectura de las pruebas.*

La acción fungistática es observada generalmente después de una incubación a 25°-30°-37°C, durante 24-48 horas (como mínimo hasta que crezca en el tubo control) y en algunos casos más días. Los resultados se suelen expresar en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$), en forma de Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.), la cual se define como «la más baja concentración de antifúngico que impide un crecimiento visible de las levaduras».

LASKIN y LECHEVALIER (1973) señalan que la C.M.I. representa la inhibición total del crecimiento de levaduras, después del cultivo en Sabouraud líquido durante 24 horas.

La acción fungicida o letal también puede ser estudiada, para lo cual se recurre a medios sin antifúngico, generalmente agar Sabouraud o Sabouraud líquido, que se resiembran con 0.05 ml o la cantidad llevada en una asa de platino, a partir del material recogido de los cultivos obtenidos para la C.M.I. en los que no se observó crecimiento visible, incubando a 30°-37°C, durante 2-3 días.

La concentración más baja, o lo que es lo mismo, la dilución más alta del antifúngico que dé lugar a falta de crecimiento, será la Concentración Mínima Fungicida (C.M.F.).

SHADOMY (1969) tomó como C.M.F. aquella que da lugar al crecimiento en la placa de tres o menos colonias.

En ocasiones (KUTSCHER y col., 1956) se ha investigado el tiempo que tarda una determinada concentración de antifúngico en producir la muerte de las levaduras, para lo cual se ponen ambos en contacto, realizando resiembras con ciertos intervalos de tiempo.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. *RECOGIDA DE MUESTRAS*

3.1.1. *En la vaca.*

Se recogieron 508 muestras (333 Frisona, 160 Pardo Alpina, 13 País, 1 Frisona x Pardo Alpina, 1 Salmantina x Frisona) durante el período 11/XI/72 al 20/IX/73, a excepción del mes de agosto.

Las vacas examinadas procedían de 30 estableos diferentes de la provincia de León, habiéndose escogido al azar, independientemente de su estado de salud, gravidez, raza, etc. (cuadro n.º 1 y mapa).

CUADRO N.º 1
Localización y n.º de muestras tomadas en vaca

Pueblos	N.º estableos	N.º muestras
Alrededores de León (capital)	6	42, 26, 29, 16, 11, 5
Vega de los Arboles	2	34, 15
Villacontilde	1	69
Mansilla de las Mulas	1	20
Mansilla Mayor	1	25
Villaverde de Sandoval	1	1
Campo de Villavidel	1	5
Valencia de D. Juan	2	82, 19
Laguna Dalga	1	46
Villadangos del Páramo	2	3, 6.
S. Martín del Camino	4	18, 18, 2, 1.
Celadilla del Páramo	2	3, 1
Villamor	2	1, 1
Sta. Marina del Rey	1	1
Palazuelo	1	1
Turcia	1	6
Sardoneda	1	1

Para la recogida de muestras se utilizaron hisopos de 38-39 cm de largo, fabricados con alambre, en uno de cuyos extremos llevaban algodón hidrófilo. Estos hisopos se mantuvieron en el interior de tubos de ensayo de 18 × 1,5 cm cerrados con tapón de gasa-algodón. Previamente a su uso fueron esterilizados en autoclave a 1 atmósfera durante 15 minutos, aunque posteriormente se comenzó a esterilizarlos en calor seco a 110°C durante 30 minutos, con el fin de evitar que se formase humedad en su interior.

Anteriormente a la toma, se limpiaba y desinfectaba la zona vulvar por medio de una esponja empapada en una solución acuosa al 1/500 de Kerol Blanco (Cooper-Zeltia); el espéculo se desinfectaba asimismo en esta solución. Previa la separación de los labios vulvares, se introducía un espéculo vaginal y a continuación el hisopo, que se rotaba repetidas veces en la vagina, con el fin de que quedase embebido del flujo presente.

3.1.2. En la oveja.

Se recogieron 201 muestras de oveja (177 Churra, 13, Manchega × Churra, 4 Sarda, 4 Texel, 2 Sarda × Churra, 1 Milkschafe) durante el período 12/1/73 al 10/VII/73.

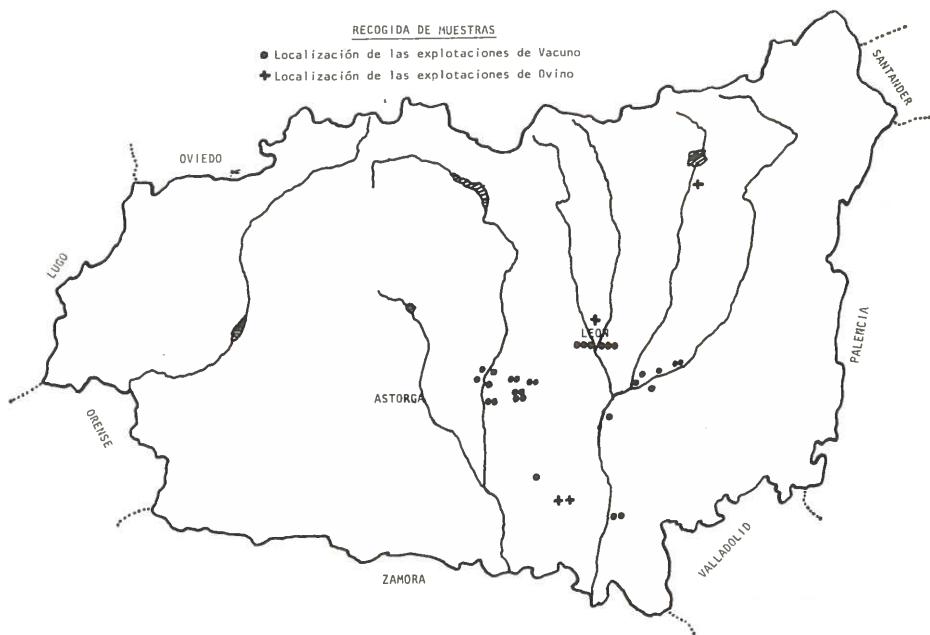
Las ovejas examinadas pertenecían a 4 explotaciones diferentes, según se indica en el cuadro adjunto (cuadro n.º 2 y mapa).

CUADRO N.º 2
Localización y n.º de muestras tomadas en oveja

Pueblos	N.º rebaños	N.º muestras
León	1	76
Boñar	1	30
Pobladura de Pelayo García	2	47, 48

Los hisopos utilizados para las tomas fueron similares a los anteriores, pero con la diferencia de ser más cortos (18 cm) y mantener protegida su parte anterior con un tubito de vidrio de 0,9 × 9 cm. abierto por los dos extremos, que sirvió de guía a la hora de introducir el hisopo en la vagina, además de protegerlo contra la contaminación (sobre todo en los casos en que no se utilizó espéculo). El conjunto de hisopo y tubito se colocó en tubos de ensayo como los descritos anteriormente, cerrados con tapones metálicos del tipo «Cap-0-Test», todo lo cual se esterilizó por el procedimiento explicado.

La recogida de muestras, salvo en lo dicho, se hizo como en la vaca.



3.2. AISLAMIENTO DE CEPAS

3.2.1. *Medio y técnica de siembra.*

Como medio de cultivo se empleó agar glucosa Sabouraud (Difco), al que se añadió cloranfenicol en la proporción de 0,05 mg/ml de medio, con el fin de evitar el crecimiento de bacterias. Una vez disuelto de cloranfenicol en alcohol etílico de 96°, en la proporción de 1 ml de alcohol/5 mg cloranfenicol, se agregó al medio de agar ya fundido, esterilizando todo a 0,8 atmósferas durante 10 minutos.

Las siembras se realizaron lo más rápidamente posible, no transcurriendo nunca más de dos horas desde la recogida, salvo en las 27 muestras pertenecientes a un circuito de inseminación.

La técnica de siembra consistió en deslizar el hisopo sobre la superficie de la placa realizando un trazo continuo en zig-zag de arriba abajo, abarcando todo el diámetro, a la vez que el hisopo se rotaba 360° con el fin de aprovechar al máximo el material recogido.

Las placas se incubaron a 37°C, durante cinco días, procediéndose a continuación al recuento de colonias y a la resiembra para su posterior identificación. La resiembra se realizó en frascos (Vaccine bottles, Griffin & George) con agar malta (Difco) inclinado, que después de 24-48 horas a 37°C, se mantuvieron a temperatura de laboratorio (posteriormente en frigorífico), resemebrándose cada 2-3 meses.

3.2.2. *Tipificación.*

Para la tipificación de las levaduras se tomaron como base las normas dadas por LODDER (1970); también nos ayudamos de las claves de BARNETT y PANKHURST (1974) y RAMÍREZ (1974).

Siguiendo a LODDER (1970), se estudiaron las características morfológicas, culturales, sexuales y fisiológicas, así como otras pruebas.

3.2.2.1. *Características morfológicas*

a) Reproducción vegetativa de las levaduras, su forma y tamaño.

En un principio se utilizó extracto de malta (Boots) al 4 % y más adelante extracto de malta (Difco), haciendo la esterilización mediante filtros Sietz de porosidad EK.

Se prepararon 4 tubos por cepa, con 4 ml de medio, de los que una vez inoculados se mantuvieron dos a 25-28°C durante 72 horas y los otros dos a temperaturas de laboratorio durante un mes. La observación de su morfología se llevó a cabo por microscopía directa, colocando 1-2 gotas sobre un portaobjetos; entre algunas especies se pudo observar una clara diferenciación morfológica (Fig. 1, 2 y 3). También se realizaron siembras en estría sobre agar malta (Difco).

b) Pseudomicelio.

Se utilizó el sistema de cultivo en portaobjetos, empleando como medio «corn meal agar» (Difco). La siembra consistió en realizar tres líneas sobre la superficie del medio, con un asa recta introducida en una suspensión de levaduras, tapando luego la parte central con un cubreobjetos. Se incubó a 25°C, durante 3-5 días, observándose el pseudomicelio directamente en el porta (Fig. 4).

c) Clamidosporas.

Se utilizaron placas con agar Czaapeck-Dox (Oxoid) + un 1 % de Tween 80, en las que se realizó mediante un asa acodada una raya longitudinal de siembra, al ras de la placa y por debajo del agar. Se incubó a 25°C, observándose la placa directamente al microscopio a las 24-48 horas.

3.2.2.2. *Características culturales.*

Se observó la formación de sedimento, anillo y película en medio líquido y las características de las colonias (forma, tamaño, color, tipo) en medio sólido. Para ello se emplearon los mismos medios y técnicas descritas para la reproducción vegetativa, forma y tamaño de las células.

3.2.2.3. *Características sexuales.*

La formación de ascosporas se investigó a partir de crecimientos en frascos inclinados de agar Gorodkowa, sembrados con cultivos jóvenes obtenidos en agar malta, el cual sirvió como medio de pre-esporulación. Se incubó a 25°C, 4 días, continuando un mes más a temperatura de laboratorio con las cepas que no esporulaban.

Las ascosporas se observaron en extensiones sobre porta, las cuales se tiñeron por el método de Wirtz modificado, quedando los esporos teñidos en color verde y las células vegetativas en rojo. La primera tinción se realizaba a los cuatro días, repitiéndose semanalmente en los casos negativos (Fig. 5).

3.2.2.4. *Características fisiológicas.*

a) Utilización de compuestos carbonados.

a.1. Por fermentación. Se realizó en tubos de hemólisis con tubito Durham en su interior, depositándose 2 ml de agua de peptona Andrade (Oxoid), con el azúcar al 2 %, salvo la rafinosa que se utilizó al 4 %. Se esterilizaron a vapor fluente, en tres sesiones de 15 minutos, sembrándose con dos gotas de una suspensión de levaduras en solución salina fisiológica. Se incubó a 25°C, durante 15 días, observándose la producción de ácido y gas.

Los azúcares empleados fueron: glucosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa.

a.2. Por oxidación. Se empleó el método auxonográfico, usando como

medio «yeast nitrogen base» (Difco) más agar Oxoid n.º 3 al 2 % y esterilizando a 0,7 atmósfera durante 15 minutos. Como inóculo se tomaron 1-2 ml de una suspensión de levaduras en solución salina fisiológica, que se mezclaron uniformemente en cada placa con el medio fundido y mantenido a unos 40°C.

Se prepararon discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro, impregnándolos en solución al 20 % del compuesto carbonado (en un principio se usaron al 5 %, pero dieron peor resultado), los que una vez secos se esterilizaban a 0,7 atmósferas durante 15 minutos.

Las placas, con 6 discos cada una, se incubaron a 25°C, una semana, observando diariamente el crecimiento alrededor de los mismos.

Los compuestos carbonados usados fueron los siguientes:

Hexosas: glucosa, D-galactosa, salicina.

Disacáridos: sacarosa, maltosa, melibiosa, celobiosa, trehalosa, lactosa.

Trisacáridos: rafinosa, melezitosa.

Polisacáridos: inulina, almidón.

Pentosas: D-xilosa, L-arabinosa, ramnosa.

Alcoholes: glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-mannitol, D-glucitol (D-sorbitol), inositol.

Ácidos: ácido láctico, ácido cítrico.

También se realizó, en algunos casos dudosos, la asimilación de compuestos carbonados en medio líquido, siguiendo la técnica descrita en el LODDER (1970) y usando como medio de cultivo «yeast nitrogen base» (Difco).

b) Utilización del nitrato potásico.

Se usó el método auxonográfico, empleando como medio de cultivo «yeast carbon base» (Difco) más agar Oxoid n.º 3 al 2 %, que se esterilizó a 0,7 atmósferas durante 15 minutos. La siembra del inóculo fue similar al sistema empleado para la asimilación de compuestos carbonados.

Una vez solidificado el medio, se depositó NO_3K en un extremo de la placa realizando una línea recta con un asa de platino. En el otro extremo y como control de crecimiento se realizó otra línea con peptona. Se incubó a 25°C, observándose el crecimiento a las 24-48 horas.

c) Crecimiento en medio libre de vitaminas.

Se utilizó como medio «vitamin free yeast base» (Difco), siguiendo la técnica dada en el LODDER (1970). La incubación se hizo a 25°C, una semana, resembrando y volviendo a incubar otra semana.

d) Crecimiento a elevadas temperaturas.

Se realizó en agar malta (Difco), sembrando en estría y comprobando el crecimiento a 37°C y 42-44°C.

3.2.2.5. Otras pruebas.

Se estudió la producción de tubos germinales, empleándose para ello tubos de hemólisis que contenían 0,5 ml de suero sanguíneo de conejo, los

cuales se sembraban con la parte superior de una colonia, incubándose a 37°C, durante tres horas, para la posterior observación de una gota al microscopio y así comprobar la existencia o ausencia de tubos germinales.

3.3. PATOGENIA EXPERIMENTAL EN EL RATÓN

3.3.1. Preparación de las suspensiones celulares.

Partiendo de cultivos en agar malta a 37°C (salvo con *C. ravaudii* y las dos cepas de *C. lambica*, que por tener un crecimiento mediocre a 37°C, se cultivaron a 27°C), durante 48 horas, se prepararon suspensiones de las levaduras en solución salina fisiológica. Por recuento en cámara de Neubauer, se ajustó la suspensión inicial a una concentración de 125 millones de levaduras por mililitro, a partir de la cual se prepararon cuatro diluciones sucesivas al 1/5 en solución salina fisiológica (25, 5, 1 y 0,2 millones por mililitro, respectivamente), que junto con la suspensión inicial se utilizaron para inocular los ratones.

3.3.2. Dosis y técnica de inoculación

Como animales de experimentación se utilizaron ratones Swiss blanco hembra, procedentes de una cepa de la O.M.S. cedida por Antibióticos, S.A. y mantenida en endogamia durante 15 años en el criadero de nuestro Departamento de Patología infecciosa y Parasitaria. El peso y la edad de los ratones normalmente osciló entre 21-26 g (con pesos extremos de 19 y 28 g) y 2-2,5 meses, respectivamente.

Con cada cepa de levaduras se inocularon 25 ratones, divididos en cinco lotes, de forma que cada lote recibió una de las cinco concentraciones empleadas. A cada ratón se le inocularon 0,2 ml. por lo que el número de levaduras recibidas, según el lote de procedencia, fue: $25 \times 10^6 = 10^{7.4}$, $5 \times 10^6 = 10^{6.7}$, $1 \times 10^6 = 10^6$, $2 \times 10^5 = 10^{5.3}$ y $4 \times 10^4 = 10^{4.6}$.

La inoculación se realizó en las venas laterales de la cola, facilitándose la operación mediante la introducción de los ratones en unos «canutos» plásticos de 3×7 cm, que se cerraban con un corcho dotado de una hendidura para permitir la salida de la cola y su fácil manejo (Fig. 6). Se favorecía la dilatación de las venas frotando la cola con alcohol-éter y se utilizaba como hemostático agua oxigenada.

Una vez inyectados, se pesaron de 5 en 5, por lotes de una misma dilución, distribuyéndose seguidamente en jaulas de plástico y recibiendo alimentación «ad libitum».

3.3.3. Examen «post-mortem»

Todos los ratones que no murieron en el plazo de los dos meses que duró la experiencia fueron sacrificados por desnucamiento, realizándose a conti-

nuación la necropsia con el fin de observar las posibles lesiones producidas. Asimismo, se hicieron observaciones microscópicas en fresco a partir de distintos órganos (riñón, hígado, bazo, etc.); de aquéllos sospechosamente afectados por levaduras (riñón sobre todo), se realizaron siembras en agar Sabouraud dextrosa + cloranfenicol o agar malta, incubando a 37°C.

3.4. SENSIBILIDAD A DISTINTOS ANTIFÚNGICOS

Se estudió la receptividad de las levaduras aisladas frente a 15 antifúngicos, por el método de las diluciones seriadas en medio de cultivo líquido.

3.4.1. *Medios de cultivo.*

Para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria se empleó caldo Sabouraud dextrosa (Difco), que una vez esterilizado se distribuyó asépticamente a razón de 4,8 ml por tubo, empleando una jeringa dosificadora automática de 10 ml B-D Cornwall (Becton, Dickinson & Co.) previamente esterilizada.

El volumen final en cada tubo fue de 5 ml, tras la adición de 0,1 ml de la solución antifúngica y 0,1 ml de la suspensión de levaduras.

Para hallar la Concentración Mínima Fungicida se utilizó agar Sabouraud dextrosa (Difco), a razón de 20 ml por placa.

3.4.2. *Antifúngicos y preparación de las diluciones.*

Los antifúngicos ensayados fueron:

- Nistatina	{	tetraenos	Antibióticos	
- Pimarcina				
- Anfotericina B	{	heptaenos		
- Tricomicina				
- Hamicina				
- Aureofungin				
- Pirrolnitrin	{			
- Griseofulvina				
- Actidiona				
- Ectimar	{			
- Clotrimazol				
- Miconazol				
- 5-Fluorocitosina				
- Tolnaftato				
- Bradosol (PDDB)				

En todos los casos se preparó una solución madre que contenía 100 mg de antifúngico en un volumen final de 10 ml, a partir del cual se realizaron diluciones de factor 2, añadiendo 3 ml de la solución madre y sucesivas a 3 ml de agua destilada estéril. De esta forma se obtuvo una batería de 16 diluciones iniciales con unas concentraciones que oscilaron desde 10.000 a 0,3051 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con lo que al añadir 0,1 ml a los tubos de cultivo, se consiguieron unas diluciones finales (factor 2) de 200 a 0,0061 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que fueron las estudiadas. En el caso del aureofungin y hamicina, se ensayó una dilución mayor, 0,0030 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Para disolver los 100 mg de antifúngico, se emplearon las sustancias y cantidades siguientes:

Para la tricomicina, 5-fluorocitosina y bradosol, el agua destilada estéril (10 ml).

Para la actidiona, griseofulvina y tolnaftato, la acetona (2, 5 y 7 ml, respectivamente).

Para el pirrolnitrin, ectimar y clotrimazol, el alcohol etílico absoluto (5 ml).

Para el miconazol, el alcohol etílico al 50 %. (5 ml).

Para la nistatina, hamicina, aureofungin, pimarcina y anfotericina B, la dimetilformamida (2, 2, 2, 4 y 4 ml, respectivamente).

En todos los casos, una vez disueltos los 100 mg de antifúngico, se completaba con agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 ml.

En bastantes antifúngicos, las diluciones iniciales más concentradas se presentaron lechosas, amarillentas o con grumos, lo que produjo turbidez en algunos de los tubos de cultivo correspondientes a las concentraciones más elevadas (principalmente con la anfotericina B, tricomicina, hamicina, aureofungin y pirrolnitrin).

La incorporación a los tubos de las soluciones antifúngicas (0,1 ml), se realizó con una jeringa automática de 2 ml, a la que se aplicó en el extremo un capilar.

3.4.3. *Preparación de los inóculos.*

A partir de un cultivo en agar Sabouraud dextrosa a 27°C, durante 24 horas, se preparó una suspensión de levaduras en agua destilada estéril, ajustándose a una concentración de 10^6 células por ml (contaje con cámara de Neubauer). A cada tubo se le inocularon 0,1 ml (100.000 levaduras), siguiendo el mismo sistema empleado para distribuir el antifúngico.

Se prepararon tubos control, unos sembrados con 0,1 ml de levaduras y sin antifúngico, y otros también sin antifúngico pero con la cantidad correspondiente de disolvente, a fin de estudiar si éste tenía efecto sobre las levaduras.

3.4.4. Lectura de las pruebas

La Concentración Mínima Inhibitoria se obtuvo después de incubar los tubos de caldo Sabouraud dextrosa a 27°C, durante 48 horas. Se observó el crecimiento por transparencia, ayudándonos con un foco de luz situado detrás de los tubos.

Se tomó como C.M.I., la dilución más alta de antifúngico que dio lugar a la falta total de crecimiento visible (Fig. 7).

En los tubos que hubo crecimiento, se comprobó por microscopía directa si era debido a levaduras y no a una contaminación bacteriana.

La Concentración Mínima Fungicida se halló a partir de los tubos para la C.M.I. en que no se observó crecimiento; partiendo de estos tubos se sembró en estría en agar Sabouraud dextrosa, tomando como inóculo el contenido de un asa de 4 mm de diámetro interno, que equivale aproximadamente a 0,01 ml.

Se incubaron las placas a 27°C, durante 48 horas, contándose a continuación el número de colonias.

Se tomó como C.M.F., la dilución más alta del antifúngico que dio lugar a falta de crecimiento en el agar o que como máximo permitió un desarrollo de 3 colonias (Fig. 8).

Todos los antifúngicos, salvo la actidiona de la que disponíamos en nuestro Departamento, nos fueron gentilmente cedidos por los laboratorios que se citan:

Pimaricina: C.H. Boehringer Sohn Ingelheim, S.A.E. (Barcelona).

Nistatina y Anfotericina B: Squibb Industria Farmacéutica, S. A. (Barcelona).

Pirrolnitrin: I/S/F/s.p.a. (Milán).

Tricomicina: Laboratorios Inibsa (Barcelona).

Estos dos últimos productos, lo fueron realmente a través de Fujisawa Pharmaceutical (Osaka).

Griseofulvina: ICI Farma, S.A. (Porriño-Pontevedra).

Aureofungin y Hamicina: Industan Antibiotics Ltd. (Pimpri-Poona-India).

5-Fluorocitosina: Productos Roche (Madrid).

Bradosol: Ciba-Geigy (Barcelona).

Miconazol: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A. (Barcelona).

Ectimar y Clotrimazol: Instituto Bayer de Terapéutica Experimental, S. A. (Barcelona).

Tolnaftato: Essex (España, S.A.) (Madrid).

Actidiona: The Upjohn Company (Kalamazoo, Michigan).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO DE CEPAS

A partir de las muestras recogidas en vagina de vaca y oveja, se consiguieron aislar 17 cepas de levaduras que se tipificaron como pertenecientes a 6 especies. Todas las características de estas cepas estuvieron de acuerdo, en líneas generales, con las dadas por LODDER y KREGER-VAN RIJ (1967) y LODDER (1970). La producción de tubos germinales, prueba que es bastante empleada en la identificación rápida de *C. albicans*, nos dió resultado negativo en todas las cepas aisladas.

4.1.1. Géneros y especies de levaduras aisladas.

4.1.1.1. En la vaca.

Se aislaron un total de quince cepas, correspondiendo trece al género *Candida* y dos al género *Pichia*.

Las especies identificadas fueron las siguientes:

Candida pseudotropicalis (Castellani) Basgal, 1911.

Candida krusei (Castellani) Berkhout, 1910.

Candida ciferrii Kreger-Van Rij, 1965.

Candida ravautii Langeron y Guerra, 1935.

Pichia membranaefaciens Hansen, 1888.

Entre las especies aisladas, lo fue en una mayor proporción *C. pseudotropicalis* (60 %), seguida a gran distancia de las restantes, como se puede observar en el cuadro n.º 3.

CUADRO N.º 3

Número y frecuencia de las especies aisladas en vaca

Especies	n.º	%
<i>C. pseudotropicalis</i>	9	60
<i>C. krusei</i>	2	13.3
<i>C. ciferrii</i>	1	6.6
<i>C. ravautii</i>	1	6.6
<i>P. membranaefaciens</i>	2	13.3

En el cuadro n.º 4 se recogen los datos sobre aislamiento de una o más especies a partir de una misma muestra, predominando el de una sola especie (84.6 %), siendo los únicos aislamientos dobles los correspondientes a las especies *C. pseudotropicalis* y *P. membranaefaciens*.

CUADRO N.º 4
Porcentaje de aislamiento puro y mixto

Especies presentes	n. ^º	muestras	%
Una	11	84,6	
Dos	2	15,4	

4.1.1.2. *En la oveja.*

Se aislaron solamente dos cepas, que se tipificaron como *Candida lambica* (Lindner y Genoud) Van Uden Buckley nov. Comb., 1913.

4.1.1.3. *Por otros autores.*

De todas las especies aisladas, *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* son encontradas por otros autores con cierta frecuencia en vagina y tracto genital de la vaca (HAJSIG y col., 1962; HAJSIG y SETINSKI, 1963; HAJSIG y TOPOLKO, 1967; WAWRZKIEWICZ y GALEZA, 1972; DECUN y ROSU, 1973), yegua (BISPING, 1963), perra (MALICKA, 1969), también el aparato genital del mono (AL-DOORY y col., 1967) y del toro (ZVEREVA y REPKO, 1968; LUKACEVIC, y col., 1963; WAWRZKIEWICZ y GALEZA, 1972). El resto de las especies aisladas no han sido localizadas en la bibliografía revisada; no obstante, VAN UDEN y col. (1958) hallaron *Pichia membranaefaciens* y *C. krusei* en el ciego de bovinos, lo que nos podría hacer pensar en una posible contaminación de la vagina a partir del intestino. Por otro lado, REY (1972), a partir de leche de abasto de la provincia de León, aisló algunas de las especies halladas por nosotros en la vagina de la vaca y oveja, (*C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. lambica* y *P. membranaefaciens*), lo que puede hacer pensar en otra modalidad de contaminación.

Podemos observar la gran disparidad de resultados entre los autores citados y, buscando una explicación a este hecho, nos adscribimos a lo que dice AL-DOORY y col. (1967): «la determinación *in vivo* de organismos en la vagina y otras partes del cuerpo, presenta problemas a la hora de comparar resultados, debido principalmente a las distintas técnicas empleadas por los diversos investigadores. Generalmente intervienen tres factores importantes: a) Tipo de medio de aislamiento, b) Temperatura de crecimiento, c) Métodos de identificación. En los estudios vaginales hay que tener en cuenta también diversos factores como la estación del año, flujo menstrual, coito, hábitos sanitarios de la hembra (se refiere a la mujer)». A todo ello añadimos nosotros la posible influencia que pueda ejercer la técnica de la toma, las diferencias entre las distintas especies animales, forma de explotación, estado clínico, etc.

4.1.2. *Otros hongos aislados.*

4.1.2.1. *En la vaca.*

Se aislaron hongos filamentosos en 31 muestras, que significaba el 6,1 % del total de muestras examinadas.

El mayor número de aislamientos correspondió a *Aspergillus fumigatus* con el 69,64 % del total de las cepas aisladas, seguido por *Mucoraceae* (23,21 %), como puede observarse en el cuadro n.º 5.

CUADRO N.º 5

Número y frecuencia de hongos filamentosos en vaca

	N. ^º	%
<i>A. fumigatus</i>	39	69,64
<i>Mucoraceae</i>	13	23,21
<i>Penicillium</i> spp.	2	3,57
No identificados	2	3,57

4.1.2.2. *En la oveja.*

Creció tan solo un hongo filamentoso, que corresponde al género *Trichoderma*, y que representa un porcentaje de positividad del 0,5 % de las muestras examinadas.

4.1.3. *Frecuencia de las levaduras aisladas.*

4.1.3.1. *En la vaca.*

A partir de las 508 muestras vaginales procedentes de igual número de vacas, de distintas razas, con buen estado clínico y gestantes o vacías, se obtuvieron 13 positivas a levaduras, que representan el 2,56 %.

No se observó que el tipo de raza pudiese tener alguna influencia significativa en el número de aislamientos, ya que en los animales de raza Parda Alpina y Frisona, su positividad fue del 3,75 % y 2,10 %, respectivamente, que no es indicativo de que este factor tenga alguna influencia en la presencia o ausencia de levaduras.

Tampoco el estado de gravidez demostró tener influencia, puesto que las 337 vacas en gestación, resultaron positivas en proporciones similares con las vacías, como puede verse en el cuadro n.º 6.

CUADRO N.º 6
Positividad a Levaduras en la Vaca

	Vacas examinadas	n.º positivas	%
En gestación	337	7	2,07
Vacías	171	6	3,50

En cuanto a factores como la edad, número de partos, etc., teniendo presente el escaso número de muestras positivas, no se ha podido observar que exista ninguna relación entre dichos factores y la presencia de levaduras.

Comparando nuestros resultados con los de los escasos autores que tratan el tema, vemos que fueron ligeramente inferiores a los de BISPING (1963) en Alemania, quien obtuvo levaduras en el 8,2 % de las muestras vaginales de 134 vacas y a los de HAJSIG y SETINSKI (1963) en Yugoslavia, que a partir de muestras de vagina, cuello y útero de 223 vacas, obtuvieron el 8,96 % de positividad.

HAJSIG y col. (1962) en Yugoslavia, partiendo de 199 vacas del matadero y por resección de los órganos genitales, con lo que la recogida de muestras fue más perfecta que con hisopos, obtuvieron levaduras en el 37,2 % de las muestras de la porción vaginal del cuello y en el 5 % de las de útero.

WARWRZKIEWICZ y GALEZA (1972), encontraron en Polonia resultados aún más altos, ya que de 200 muestras obtuvieron una positividad del 35,5 % para la vagina y del 21 % para las de útero, pero hay que tener en cuenta que dichas cifras incluye tanto las levaduras como los hongos filamentosos.

Los estados patológicos del tracto genital determinan un aumento en la presencia de levaduras, como se deduce de los altos porcentajes de aislamiento comunicados por LYSenko y MILORAOVICH (1966) en Rusia, HAJSIG y TOPOLKO (1967) en Yugoslavia y DECUN y ROSU (1973) en Rumanía quienes aislaron levaduras prácticamente en todos los casos estudiados, partiendo, respectivamente, de vacas con fluido vaginal patológico, de contenido uterino procedente de endometritis mucopurulenta y de secreciones patológicas o normales del cuello.

4.1.3.2. En la oveja.

En 201 muestras vaginales procedentes de igual número de ovejas de distintas razas y con buen estado general, gestantes o vacías, se obtuvieron 2 positivas a levaduras, que representa un 0,99 % del total.

El escaso número de aislamientos, dato que consideramos podría ser peculiar en el ganado ovino, impide establecer relaciones de acuerdo con la

raza, edad, gestación, etc. Tampoco puede establecerse comparación con los datos de otros autores, pues en la bibliografía examinada no llegamos a encontrar ningún trabajo sobre aislamiento de levaduras en la vagina de la oveja u otra zona del tracto genital.

4.1.3.3. En otras especies.

Nuestros resultados, para la vaca y oveja, son muy inferiores a los obtenidos por MANERO (1972) en León, con muestras procedentes de la vagina de mujeres gestantes, que alcanzaron el 19,1 % de positividad; según la revisión que realiza este autor, los porcentajes más comunes para la mujer en los diferentes países están comprendidos entre el 20-40 %; todo ello nos hace pensar en que la mayor positividad en la mujer pueda ser como consecuencia de un mayor contacto o promiscuidad sexual.

AL-DOORY y col. (1967) en EE. UU., dan en la vagina de la mona una positividad a levaduras del 52 % (datos calculados por nosotros a partir del 61 % que citan para levaduras más hongos filamentosos), lo cual podría explicarse por las mismas circunstancias que en la mujer.

En Alemania, partiendo de yeguas sanas, BISPING (1963) encontró el 10,4 % de muestras positivas a levaduras en vagina y KRABISCH (1971) el 9,6 % en cuello.

En Polonia, MALICKA (1969) obtuvo en vagina de perra tras la necropsia, el 14 % de positividad. MORENO y col. (1973) en Brasil, a partir de perras con procesos genitales, señaló el 7 %.

4.1.4. Recuento de colonias.

El número de colonias obtenido en las placas de siembra fue generalmente escaso. Predominaron los aislamientos de 4 a 8 colonias y únicamente se dio un caso de crecimiento relativamente abundante, con 50.

4.2. PATOGENIA EXPERIMENTAL

Ninguna de las seis especies de levaduras aisladas en vaca y oveja, resultó letal para el ratón por vía intravenosa, durante los dos meses que duró la experiencia. Al final de ésta, los ratones fueron sacrificados y necropsiados, comprobándose que *C. krusei*, *C. lambica*, *C. ravaudii*, *P. membranaefaciens* y algunas cepas de *C. pseudotropicalis*, resultaron totalmente inocuas. Tan sólo se notaron ciertas alteraciones en algunos de los ratones inoculados con tres cepas de *C. pseudotropicalis* y con *C. ciferrii*.

Las tres cepas citadas de *C. pseudotropicalis* llegaron a afectar al 50-70 % de los ratones inoculados con las concentraciones más altas (25×10^6 y 5×10^6), observándose, en el hígado de algunos animales, la existencia de zonas pálidas con apariencia que recordaba la degeneración grasa y en los riñones de

otros, un ligero aumento de tamaño, con presencia de focos blanquecinos indurados.

C. Ciferii, también en las concentraciones más elevadas, determinó en algunos ratones una parálisis de cabeza, con inclinación hacia un lado, manifestando tendencia a andar en círculo en esa dirección, lo que a los dos meses había desaparecido en la mayoría de los afectados. En la necropsia, presentaron lesiones en el riñón, similares a lo señalado para *C. pseudotropicalis*.

Las siembras realizadas a partir de las lesiones, dieron lugar al crecimiento de levaduras en algunos casos, pero fueron negativas en otros.

Nuestros resultados concuerdan con los de MANKOWSKI (1957), HASENCLEVER (1959) y FERNÁNDEZ-DÍEZ y col. (1974), los cuales encontraron que *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* por vía intravenosa, en concentraciones de 4×10^6 , 5×10^6 y 25×10^6 , respectivamente, no producían mortalidad en el ratón. A idéntico resultado llegaron RAMANANDA RAO y SIRSI (1964) en relación con *C. krusei*.

Sin embargo, tanto HURLEY y WINNER (1964) con respecto a *C. krusei* y *C. pseudotropicalis*, como HURLEY y MORRIS (1964) con relación a *C. krusei*, afirmaron que en algunos casos resultaban patógenas para el ratón, dando lugar a lesiones esencialmente de localización renal. MANKOWSKI (1957), por otro lado, indica que *C. krusei* podía ser ocasionalmente patógena para ratones de 6-8 meses de edad.

Realmente todas las especies aisladas por nosotros son prácticamente apatógenas y exclusivamente *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*, se citan en algunas ocasiones como relacionadas con procesos patológicos.

Con respecto a *C. lambica*, *C. ravautii*, *C. ciferrii* y *P. membranaefaciens*, no hemos localizado trabajos sobre patogenia experimental en ratón.

4.3. SENSIBILIDAD A DISTINTOS ANTIFÚNGICOS

Los resultados de las diversas pruebas se indican en el cuadro n.º 7.

En relación con las diferentes especies estudiadas se pudo observar que:

Sobre *C. pseudotropicalis*, el antifúngico más activo resultó ser el aureofungin con una C.M.I. de $0.097 \mu\text{g}/\text{ml}$, seguido de cerca por la hamicina y bradosol, ambos con unas C.M.I., según la cepa, de 0,097 y 0,19 microgramos por mililitro.

Con *C. lambica* y *C. krusei*, la mayor actividad correspondió a la tricomicina, aureofungin y hamicina, resultando inhibidas con 0.012 y $0.024 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

En *C. ciferrii*, el aureofungin con $0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$ fue el de mayor acción inhibidora, seguido por la anfotericina B con $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ y la nistatina, pimaricina y bradosol con $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Sobre *C. ravautii*, el aureofungin y la anfotericina B inhibieron el crecimiento con $0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$, actuando seguidamente la hamicina con $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Sobre *P. membranaefaciens*, la mayor acción correspondió a la tricomicina y aureofungin con $\leq 0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$, seguidos de la hamicina.

Las C.M.I. y C.M.F. de los distintos antifúngicos en relación con las levaduras aisladas, nos indican lo siguiente:

Nistatina: se obtuvo una C.M.I. de $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$ en *P. membranaefaciens* y para *Candida* spp. osciló entre 0.39 - $3.12 \mu\text{g}/\text{ml}$; concretándonos a *C. krusei*, fue de $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ quedando por debajo de la dada por algunos laboratorios que la comercializan, así Lab. Inibsa da la cifra de $1.96 \mu\text{g}/\text{ml}$ y Lab. Squibb la de $6.25 \text{ U} (\simeq 2.08 \mu\text{g}/\text{ml})$. En medio sólido, HEJZLAR y VYMOLA (1970) daban para *C. krusei* 3.12 - $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ y BODENHOFF (1971) señaló $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. pseudotropicalis*. Realizando el estudio de ambas especies en medio líquido, CARETTA y FURESZ (1958) obtuvieron $6.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, cifra unas 4 veces superior a la nuestra para *C. krusei*. La C.M.F., en la mayoría de las cepas, se elevó hasta el doble o cuádruple de la C.M.I., resultados a los que también llegaron PANIKER y col. (1963); fueron excepciones *C. ciferrii*, en la cual era idéntica y *C. lambica*, en la que resultó ocho veces mayor.

Pimaricina: la C.M.I. fue de $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *P. membranaefaciens*, estando comprendida entre 1.56 y $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ en *Candida* spp. DROUHET (1965) dio resultados similares, tales como $3.12 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* y 0.78 - $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ para otras cándidas. En medio sólido, FEGELER y col. (1966) señalaron 6.2 - $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. krusei* y WILFEUER (1973) también $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. krusei* y *C. pseudotropicalis*. La C.M.F. coincidió con la C.M.I. en gran parte de las cepas; sin embargo, fue doble en dos de *C. pseudotropicalis*, en *C. ciferrii* y *C. ravautii*, y cuádruple en una cepa de *C. pseudotropicalis*.

Anfotericina B: la C.M.I. en *P. membranaefaciens* fue de $0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$, y en las cándidas osciló entre 0.19 y $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$, siendo *C. pseudotropicalis* la que se mostró más resistente. HOWARTH y col. (1975) dieron una C.M.I. de $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. pseudotropicalis* habiendo resultado el doble la C.M.F. En medio sólido, BODENHOFF (1971) señala para la especie citada anteriormente una C.M.I. similar a la obtenida por nosotros en medio líquido y da cifras comprendidas entre 1 a $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ para otras especies del género *Candida*. También en medio sólido, SCHOLER (1970) señaló para *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*, 0.2 y $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, mientras que HAMILTON-MILLER (1972) encontró valores de 4 y más de $6 \mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. normalmente fue de 2 a 8 veces la C.M.I., con las excepciones de una cepa de *C. pseudotropicalis* en que fue igual, y en *C. ravautii* que resultó ser 16 veces más alta.

Tricomicina: ninguna de las diluciones preparadas permitió el crecimiento de *P. membranaefaciens*, por lo que su C.M.I. fue de $0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$, o menor. En las cándidas, la C.M.I. osciló entre 0.012 y $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$, resultando *C. ravautii* la más resistente. CARETTA y FURESZ (1958) obtuvieron una C.M.I. para *C. pseudotropicalis* de $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ y para *C. krusei* de $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$; los laboratorios

Inibsa indican una C.M.I. en *C.krusei* de 0,056 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estando comprendida la de otras especies del género *Candida* entre 0,028 y 0,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. en nueve de las cepas estudiadas fue idéntica a la C.M.I. y en cinco resultó el doble, siendo completamente distinta en sus resultados *C. ravautii* en la cual era 32 veces superior.

Hamicina: la C.M.I. frente a *P. membranaefaciens* fue 0,006 y 0,012 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo para las cándidas de 0,012 a 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *C. ciferrii* fue la especie más resistente. ATHAR (1971), encontró para *C. pseudotropicalis* una C.M.I. que osciló de 0,01 a 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para *C. krusei*, de 0,02 a 0,16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, así como resultados similares para otras cándidas. Debido a una dificultad en el desarrollo de la prueba, no hemos podido obtener la C.M.F. en *C. pseudotropicalis*, por lo que solamente sabemos que es superior a 1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que fue la concentración más alta empleada. En el resto de las especies, osciló entre ser igual a la C.M.I. a cuatro veces este valor, excepto con una cepa de *C.lambica* en que fue 32 veces mayor y en *C. ravautii*, 128 veces más elevada.

Aureofungin: la C.M.I. para *P. membranaefaciens* fue de 0,006 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para las cándidas osciló entre 0,012 y 0,19 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Carecemos de datos sobre las especies aisladas por nosotros, pero para *C. albicans* THIRUMALACHAR y col. (1964) obtuvieron una C.M.I. de 0,01 a 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el laboratorio «Industan Antibiotics» da la de 0,01 a 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. fue idéntica a la C.M.I. en *P.membranaefaciens*, *C. krusei* y *C. lambica*, el doble en *C. ciferrii*, ocho veces mayor en *C. ravautii* y de 8 a 32 veces más alta en *C. pseudotropicalis*.

Pirrolnitrin: para *P. membranaefaciens* la C.M.I. fue de 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo en todas las especies de *Candida* mayor de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, excepto *C. ciferrii* que alcanzó 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. de *P. membranaefaciens* fue de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para una cepa y superior a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la otra. En las cepas de *Candida* spp. alcanzó cifras superiores a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. NISHIDA y col. (1965), LU (1971) y GORDEE y MATTHEWS (1967 y 1969) dieron una C.M.I. para *C. albicans* de 12,5 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo la C.M.F. el doble o cuádruple, según los últimos autores. NISHIDA y col. (1965) señalaron una C.M.I. mayor de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *Torula utilis* y LU (1971), de 25 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para varias cándidas.

Griseofulvina: careció de efecto sobre las levaduras estudiadas en la máxima concentración empleada (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), no inhibiendo el crecimiento de ninguna de las cepas. Nuestros resultados coinciden con los de diferentes autores como BLANK y ROTH (1959), ROTH, SALLMAN, y BLANK (1959), O'GRADY y col. (1963), NEGRONI (1966), etc., todos los cuales hablan de la falta de efecto de la griseofulvina sobre *C. albicans* y diferentes levaduras, incluso a altas concentraciones.

Actidiona: la C.M.I. en *P. membranaefaciens* fue de 0,39 y 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$; para *C. krusei*, 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$; en *C. lambica*, 1,56 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *C. pseudotropicalis*, *C. ciferrii* y *C. ravautii* no fueron inhibidas con la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. resultó ser 4 veces más alta que la inhibitoria en *C.*

krusei, mientras que en *C. lambica* y *P. membranaefaciens*, varió entre ser 16 y 64 veces superior. Los laboratorios Upjohn conceden para *P. membranaefaciens* una C.M.I. de 0,17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para otras levaduras indican ausencia de inhibición incluso a dosis elevadas. NEGRONI (1966) comprobó que concentraciones de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no afectan a varias cándidas. FRIEDRICH y BOHME (1974) observaron que en medio sólido, cantidades de 400-500 microgramos por mililitro no impedían el crecimiento de *C. pseudotropicalis*, mientras que *C. krusei* era parcial o completamente inhibida.

Ectimar: para las cepas de *P. membranaefaciens* la C.M.I. fue de 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en las cándidas estuvo comprendida entre 6,21 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. fue idéntica a la C.M.I., salvo en una cepa de cada una de las especies *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. lambica* y *P. membranaefaciens*, donde resultó ser doble. PLEMPER y BOSHAGEN (1968) señalaron para *C. albicans* y *C. parapsilosis* una C.M.I. de 4-10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

Clotrimazol: *P. membranaefaciens* tuvo una C.M.I. de 0,78 y 1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$, oscilando en las cándidas entre 0,39 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *C. ciferrii*, seguida de *C. pseudotropicalis*, fueron las especies más resistentes. La C.M.F. en la mayoría de las cepas alcanzó igual o doble valor que la C.M.I.; para *C. ciferrii* fue mayor de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nuestros resultados, en cuanto a la C.M.I. de *C. krusei* (0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$) están dentro de los de HAMILTON-MILLER (1972) y WEHRSPANN (1971), que dieron cifras comprendidas entre 0,5 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No ocurre así respecto a *C. pseudotropicalis*, ya que nosotros obtuvimos unas cifras de 25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que son superiores a las de aquéllos y también a las de BODENHOFF (1971), que oscilaron entre 0,08 a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Asimismo, para otras especies de *Candida*, señalaron unas concentraciones inhibitorias de 0,02 a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Miconazol: la C.M.I. para *P. membranaefaciens* fue de 0,39 y 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para las cándidas de 1,56 a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo la más resistente *C. ravautii*. La C.M.F. fue del mismo valor o el doble de la inhibitoria, salvo en una cepa de *P. membranaefaciens* que era 4 veces mayor y en *C. ciferrii* que lo fue 16 veces. Los Laboratorios «Janssen Pharmaceutica» dan para *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* unas C.M.I. de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que SREEDHARA y col. (1974) conceden 0,1 y 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Estos últimos autores, en varias especies de *Candida*, obtienen unas C.M.I. comprendidas entre 0,01 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5-Fluorocitosina: se obtuvo una C.M.I. para *P. membranaefaciens* de 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; en las cándidas osciló entre 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y por encima de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las más resistentes fueron *C. krusei* con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *C. ravautii* con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y *C. ciferrii* con más de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. fue idéntica a la C.M.I. en *C. lambica*, una cepa de *P. membranaefaciens* y casi todas las de *C. pseudotropicalis* (salvo dos de ellas en que fue 2 y 4 veces mayor); para *C. krusei*, *C. ciferrii*, *C. ravautii* y una cepa de *P. membranaefaciens*, resultó superior a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. HAMILTON-MILLER (1972) y SCHOLER (1970), en medio

sólido, dieron una C.M.I. para *C. krusei* de 1 a 5 y 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para *C. pseudotropicalis*, de 0,25 y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. En otras especies de *Candida*, SCHONEBECK y ANSEHN (1973) encontraron unas C.M.I. de 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a más de 1.638 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que SHADOMY y col. (1973) dan cifras entre 12,5 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tolnaftato: conocido por su acción sobre los dermatofitos, en la máxima concentración empleada (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), no inhibió el crecimiento de ninguna de las cepas estudiadas. Los diferentes autores coinciden en la falta de acción del tolnaftato sobre las levaduras. GRACIA JOVER y col. (1967) informaron que *C. albicans* no era inhibida por concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. WEINSTEIN y col. (1964), ROBINSON (1964), JASKOSKI y THOMPSON (1967), WAIT y col. (1971) y otros, afirmaron asimismo la falta de actividad sobre *C. albicans*.

Bradosol: inhibió el crecimiento de *P. membranaefaciens* a la concentración de 0,39 y 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.I. para las cándidas estuvo comprendida entre 0,097 y 1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La C.M.F. osciló entre ser idéntica a la inhibitoria hasta 8 veces el valor de ésta, siendo lo más corriente los valores idénticos o dobles. KUTSCHER y col. (1954 y 1956) encontraron que tenía una fuerte actividad sobre *C. albicans*, a la que inhibía en diluciones de 1/48.000 a 1/192.000.

Como resumen de lo descrito previamente podemos deducir (Cuadro n.º 8), que el aureofungin resulta ser el antifúngico más efectivo, ya que con todas las especies ha dado siempre la Concentración Mínima Inhibitoria más baja, siendo la C.M.I. media con respecto a todas las cepas, alrededor de 0,08 microgramos por mililitro. Le siguió la hamicina cuya C.M.I. media fue de 0,31 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A continuación y por orden de mayor a menor efectividad tendríamos, bradosol (0,42 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tricomicina (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nistatina (1,42 $\mu\text{g}/\text{ml}$) anfotericina B (2,18 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y pimaricina (2,57 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ya a una distancia mayor, con unas C.M.I. más elevadas tenemos, miconazol (6,54 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ectimar (13,23 $\mu\text{g}/\text{ml}$), clotrimazol (24,54 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 5-fluorocitosina (39,88 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La actidiona fue poco efectiva y el pirrolnitrin prácticamente no inhibió el crecimiento de ninguna especie, si se exceptúa *P. membranaefaciens*. La griseofulvina y el tolnaftato, de gran acción sobre los dermatofitos, pero que en líneas generales tienen poca o nula actividad hacia las cándidas, no inhibieron el crecimiento de las cepas estudiadas a ninguna concentración (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la más alta).

En términos generales, las especies más resistentes a los antifúngicos ensayados fueron *C. ciferrii* y *C. ravautii*, seguidas de *C. pseudotropicalis*.

Las C.M.F. oscilaron desde valores idénticos a la C.M.I., hasta ser 128 veces más altos, como ocurrió excepcionalmente con la hamicina sobre *C. ravautii*. Resultan sin embargo más abundantes los casos en que la C.M.F. fue idéntica a la inhibitoria, seguido a continuación de aquéllos en los que era solamente 2 y 4 veces superior.

CUADRO N.º 7
Sensibilidad «in vitro» de las levaduras aisladas a diversos antifúngicos ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Cepa	Nistatina		Pimaricina		Anfotericina		Tricomicina		Hamicina	
	C.M.I.	C.M.F.	C.M.I.	C.M.F.	C.M.I.	C.M.F.	C.M.I.	C.M.F.	C.M.I.	C.M.F.
10v	0,78	3,12	1,56	3,12	1,56	6,25	0,19	0,19	0,048	>1,56
29v	3,12	6,25	3,12	6,25	6,25	50	3,12	3,12	0,19	>1,56
30v	3,12	6,25	3,12	6,25	6,25	50	1,56	3,12	0,19	>1,56
31v	3,12	6,25	6,25	6,25	6,25	50	3,12	3,12	0,19	>1,56
<i>Candida pseudotropicalis</i>										
33v	3,12	6,25	3,12	6,25	6,25	25	3,12	6,25	0,19	>1,56
48v	0,78	3,12	6,25	6,25	3,12	3,12	0,19	0,19	0,097	>1,56
53v	0,78	3,12	1,56	6,25	1,56	6,25	0,19	0,19	0,097	>1,56
54v	0,78	3,12	3,12	3,12	1,56	6,25	0,19	0,19	0,19	>1,56
57v	0,78	3,12	1,56	1,56	1,56	6,25	0,19	0,39	0,19	>1,56
<i>Candida krusei</i>										
43v	1,56	6,25	1,56	1,56	0,39	1,56	0,024	0,024	0,024	0,097
47v	1,56	6,25	1,56	1,56	0,78	6,25	0,024	0,024	0,024	0,024
<i>Candida lambica</i>										
30ve	0,39	3,12	1,56	1,56	0,39	0,78	0,012	0,012	0,012	0,024
40ve	0,39	3,12	1,56	1,56	0,19	0,78	0,012	0,024	0,012	0,39
<i>Candida ciferrii</i>										
37v	1,56	1,56	1,56	3,12	0,39	0,78	3,12	3,12	3,12	3,12
<i>Candida ravautii</i>										
62v	1,56	6,25	3,12	6,25	0,19	3,12	6,25	200	0,78	100
<i>Pichia membranaefaciens</i>										
55v	0,39	0,78	1,56	1,56	0,19	0,39	<0,006	<0,006	0,012	0,024
56v	0,39	0,78	1,56	1,56	0,19	0,39	<0,006	<0,006	0,006	0,024

* C. M. I. (Concentración Mínima Inhibitoria)

* C. M. F. (Concentración Mínima Fungicida).

CUADRO N.º 7 (Continuación)

		Sensibilidad «in vitro» de las levaduras aisladas a diversos antifúngicos ($\mu\text{g/ml}$)							
s&d C	C.M.I. / C.M.F.	Aureofungin	Pirrolnitrin	Griseofulvina	C.M.I. / C.M.F.	C.M.I. / C.M.F.	Acidiona	C.M.I. / C.M.F.	Ectimar C.M.I. / C.M.F.
10v	0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
29v	0,19 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
30v	0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
31v	0,097 3,12	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	6,25 6,25
<i>Candida pseudotropicalis</i>	33v 0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
	48v 0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
53v	0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
54v	0,097 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 25
57v	0,097 3,12	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
<i>Candida krusei</i>	43v 0,024 0,024	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
	47v 0,024 0,024	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
<i>Candida lambica</i>	30ve 0,012 0,012	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
	40ve 0,012 0,012	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
<i>Candida ciferrii</i>	37v 0,19 0,39	100	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25 25
	62v 0,19 1,56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	25 25
<i>Candida ravautii</i>	55v 0,006 0,006	12,5	100	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 25
	56v 0,006 0,006	25	>200	>200	>200	>200	>200	>200	12,5 12,5
<i>Pichia membranafaciens</i>									

* C. M. I. (Concentración Mínima Inhibitoria)

* C. M. F. (Concentración Mínima Fungicida).

CUADRO N.º 7 (Continuación)

		Sensibilidad «in vitro» de las levaduras aisladas a diversos antifúngicos ($\mu\text{g/ml}$)							
s&d C	C.M.I. / C.M.F.	Clotrimazol	Miconazol	5-Fluoroci- tosina C.M.I. / C.M.F.	Tolnaftato C.M.I. / C.M.F.	Tolnaftato C.M.I. / C.M.F.	Tolnaftato C.M.I. / C.M.F.	Bradiosol C.M.I. / C.M.F.	
10v	25 25	6,25	6,25	0,78	0,78	>200	>200	0,097 0,39	
29v	25 50	6,25	12,5	3,12	12,5	>200	>200	0,097 0,19	
30v	25 100	6,25	12,5	0,78	0,78	>200	>200	0,097 0,19	
31v	50 100	6,25	12,5	0,78	0,78	>200	>200	0,19 0,19	
<i>Candida pseudotropicalis</i>	33v 25 100	6,25	12,5	0,78	0,78	>200	>200	0,19 0,19	
	48v 50 50	6,25	6,25	0,78	0,78	>200	>200	0,097 0,78	
<i>Candida krusei</i>	53v 25 50	6,25	6,25	0,78	1,56	>200	>200	0,19 1,56	
	54v 50 100	6,25	6,25	0,78	0,78	>200	>200	0,19 0,19	
<i>Candida lambica</i>	57v 25 50	6,25	6,25	0,78	0,78	>200	>200	0,19 0,78	
	43v 0,78 0,78	3,12	3,12	100	>200	>200	>200	0,39 0,39	
<i>Candida ciferrii</i>	47v 0,78 0,78	3,12	3,12	100	>200	>200	>200	0,39 0,39	
	30ve 0,39 0,39	6,25	6,25	25	25	>200	>200	0,39 0,39	
<i>Candida ravautii</i>	40ve 0,39 0,78	1,56	1,56	6,25	6,25	>200	>200	1,56 1,56	
	37v 100 >200	12,5	100	>200	>200	>200	>200	1,56 3,12	
<i>Pichia membranafaciens</i>	55v 1,56 1,56	3,12	6,25	12,5	12,5	>200	>200	0,39 0,78	
	56v 0,78 0,78	0,39	1,56	25	>200	>200	>200	0,78 1,56	

* C. M. I. (Concentración Mínima Inhibitoria)

* C. M. F. (Concentración Mínima Fungicida).

C. M. I. (Media de todas las cepas) (μ g/ml)

AUREOFUNGIN	0.08
HAMICINA	0.31
BRADOSOL	0.42
TRICOMICINA	1.25
NISTATINA	1.42
ANFOTERICINA B	2.18
PIMARICINA	2.57
MICONAZOL	6.54
ECTIMAR	13.23
CLOTRIMAZOL	24.54
5-FLUOROCITOSINA	39.88
ACTIDIONA	escasa acción
PIRROLNITRIN	escasa acción
GRISEOFULVINA	sin acción a 200
TOLNAFTATO	sin acción a 200

5. CONCLUSIONES

1. A partir de 508 muestras vaginales de vacas, en buen estado clínico, se obtuvieron 13 positivas a levaduras, lo que significa el 2,56 % de las muestras examinadas. Las levaduras aisladas fueron las siguientes: *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida ciferrii*, *Candida ravautii* y *Pichia membranaefaciens*. La más frecuente fue *Candida pseudotropicalis*, que supuso el 60 % del total de cepas aisladas.

2. A partir de 201 muestras vaginales de ovejas, en buen estado clínico, se obtuvieron 2 positivas a levaduras, lo que significa el 0,99 % de las muestras examinadas. Se aisló *Candida lambica*.

3. Como resultado accesorio al trabajo, también se aislaron hongos filamentosos, que en la vaca se tipificaron como: *Aspergillus fumigatus* (69, 64 % del total de hongos aislados), *Mucoraceae*, *Penicillium* spp. y otros no identificados. Los aislamientos de hongos filamentosos representaron el 6,1 % de muestras positivas.

En la oveja solamente se aisló en una ocasión *Trichoderma* spp., que representa un porcentaje de positividad del 0,5 % de las muestras examinadas.

4. No se observó relación entre la edad, estado de gestación, número de partos, raza, etc. y la presencia de levaduras en vagina.

5. Ninguna de las seis especies de levaduras aisladas resultó letal para el ratón, por vía intravenosa, ni siquiera a las dosis más altas inoculadas ($10^{7.4}$).

6. A partir del estudio de la sensibilidad de las levaduras aisladas frente a diversos antifúngicos, se obtuvieron las C.M.I. medias siguientes: aureofungin, 0,08 μ g/ml; hamicina, 0,31 μ g/ml; bradosol, 0,42 μ g/ml; tricomicina, 1,25 μ g/ml; nistatina, 1,42 μ g/ml; anfotericina B, 2,18 μ g/ml; pimaricina, 2,57 μ g/ml; miconazol, 6,54 μ g/ml; ectimar, 13,23 μ g/ml; clotrimazol, 24,54 μ g/ml; 5-fluorocitosina, 39,88 μ g/ml. Actidiona y pirrolnitrin, prácticamente en todas las cepas, dieron una C. M. I. por encima de las concentraciones más altas empleadas en el trabajo (200 μ g/ml). Griseofulvina y tolnaftato, no inhibieron nunca el crecimiento de las levaduras.

6. RESUMEN

Con el fin de conocer la prevalencia de levaduras en la vagina de la vaca y oveja, se realizó un estudio en animales que se encontraban en buen estado clínico, recogiéndose muestras vaginales de 508 vacas y 201 ovejas.

Resultaron positivas a levaduras el 2,56 % de las muestras de vaca, aislándose *Candida pseudotropicalis* (60 % del total de cepas obtenidas), *C. krusei* y *Pichia membranaefaciens* (13,3 %) y *C. ciferrii* y *C. ravautii* (6,6 %). En las ovejas solamente resultaron positivas a levaduras el 0,99 %, identificándose la especie *C. lambica*.

Se observó crecimiento de hongos filamentosos en el 6,1 % de las muestras de vaca, aislándose *Aspergillus fumigatus* (69,64 % del total de cepas obtenidas), *Mucoraceae* (23,21 %), *Penicillium* spp. (3,57 %) y otros hongos no identificados (3,57 %). En la oveja la positividad fue del 0,5 %, identificándose *Trichoderma* spp.

Se realizó la inoculación experimental en ratones, por vía intravenosa, con las cepas de levaduras aisladas, a las dosis de $10^{4.6}$, $10^{5.3}$, 10^6 , $10^{6.7}$ y $10^{7.4}$, no resultando letal ninguna de las levaduras.

Por el método de las diluciones seriadas en medio líquido, se obtuvo la C.M.I. de 15 antifúngicos frente a las levaduras citadas; asimismo se obtuvo la C.M.F., en medio sólido. Se ensayaron las diluciones de antifúngico (factor 2) comprendidas entre 0,0030 y 200 microgramos por mililitro del medio de cultivo. El antifúngico más efectivo fue el aureofungin, con una C.M.I. media sobre todas las cepas de 0,08 μ g/ml, seguido de la hamicina (0,31 μ g/ml), bradosol (0,42 μ g/ml), tricomicina (1,25 μ g/ml), nistatina (1,42 μ g/ml), anfotericina B (2,18 μ g/ml), pimaricina (2,57 μ g/ml), miconazol (6,54 μ g/ml), ectimar (13,23 μ g/ml), clotrimazol (24,54 μ g/ml), 5-fluorocitosina (39,88 μ g/ml); actidiona y pirrolnitrin inhibieron el crecimiento de muy pocas cepas y griseofulvina y tolnaftato carecieron de acción inhibitoria.

En términos generales, las especies más resistentes fueron *C. ciferrii* y *C. ravautii*, seguidas de *C. pseudotropicalis*.

Las C.M.F. oscilaron desde valores idénticos a la C.M.I. hasta ser 128 veces más altos, como ocurrió excepcionalmente con la hamicina sobre *C. ravautii*. Resultaron sin embargo más abundantes los casos en que la C.M.F. fue idéntica a la inhibitoria, seguidos a continuación de aquéllos en los que fue solamente 2 y 4 veces superior.

RESUME

A fin de connaître la prevalence des levures dans le vagin des vaches et des brebis, on a effectué une étude avec des animaux qui se trouvaient en bon état clinique, en utilisant 508 et 201 échantillons de vagin de vache et de brebis, respectivement.

Le 2,56 % des échantillons de vagin de vache donnèrent des résultats positifs aux levures, et on isola le *Candida pseudotropicalis* (60 % du total de souches obtenues), le *C. krusei* et le *Pichia membranaefaciens* (13,3 %), et le *C. ciferrii* et la *C. ravautii* (6,6 %). Dans les échantillons de vagin de brebis le 0,99 % seulement furent positifs aux levures, et on identifia le *C. lambica*.

On observa un développement de champignons filamenteux dans le 6,1 % des échantillons de vagin de vache, et on isola l'*Aspergillus fumigatus* 69,64 % du total de souches obtenues), le *Mucoraceae* (23,21 %), le *Penicillium* spp. (3,57 %) et d'autres champignons non identifiés (3,57 %). Dans les échantillons de vagin de brebis le 0,5 % furent positifs, et on identifia le *Trichoderma* spp.

On effectua l'inoculation expérimentale chez des souris, par la voie intraveineuse, avec les souches de levures isolées, à une dose de $10^{4.6}$, $10^{5.3}$, 10^6 , $10^{6.7}$ et $10^{7.4}$; aucune levure fut létale.

En utilisant la méthode des dilutions en série dans un milieu liquide on a obtenu la C.M.I. de 15 antifongiques contre les levures susdites; on a obtenu également la C.M.F. dans un milieu solide. On essaya les dilutions de l'antifongique (facteur 2), comprises entre 0,0030 et 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ du milieu de culture. L'antifongique le plus effectif fut l'aerofungin, avec une C.M.I. moyenne de 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sur toutes les souches, suivi par la hamicine (0,31 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le bradosol (0,42 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la tricomicine (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la nistatine (1,42 $\mu\text{g}/\text{ml}$), l'amphotericine B (2,18 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la pimaricine (2,57 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le miconazol (6,54 $\mu\text{g}/\text{ml}$), l'ectimar (13,23 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le clotrimazol (24,54 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5-fluorocytosine (39,88 $\mu\text{g}/\text{ml}$); l'actidione et le pirrolnitrin inhibèrent le développement de très peu de souches, et la griséofulvine et le tolナphosphate n'eurent pas d'action inhibitoire.

En général, les espèces les plus résistantes furent la *C. ciferrii* et la *C. ravautii*, suivies par la *C. pseudotropicalis*.

Les C.M.F. oscillèrent dès valeurs identiques à la C.M.I. jusqu'à 128 fois supérieures, comme il arriva exceptionnellement avec la hamicine sur la *C.*

ravautii. Cependant, les cas dans lesquels la C.M.F. fut identique à l'inhibiteur furent les plus nombreux, suivis par d'autres dans lesquels elle fut seulement 2 et 4 fois supérieure.

SUMMARY

In order to know the prevalence of yeasts in the vagina of cows and sheep a study has been carried out with animals being in a good clinical condition, collecting 500 and 201 vagina samples from cows and sheep respectively.

2.56 % of the vagina samples collected from cows were positive against yeasts and *Candida pseudotropicalis* (60 % of the total strains obtained), *C. krusei* and *Pichia membranaefaciens* (13,3 %) and *C. ciferrii* and *C. ravautii* (6,6 %) were isolated. 0.99 % of the vagina samples collected from sheep were positive against yeasts, and *C. lambica* was identified.

A development of filamentous fungi was observed in 6.1 % of vagina samples from cows, and *Aspergillus fumigatus* (69.64 % of the total strains obtained), *Mucoraceae* (23.21 %), *Penicillium* spp. (3.57 %) and other non-identified fungi (3.57 %) were isolated. In the vagina samples from sheep only 0.5 % were positive, and *Trichoderma* spp was identified.

An experimental inoculation was made in mice, through intravenous route, using the strains of yeast isolated, at a dosage of $10^{4.6}$, $10^{5.3}$, 10^6 , $10^{6.7}$ and $10^{7.4}$, but no yeast was lethal.

Using the method of serial dilutions in a liquid medium, the M. I. C. of 15 antifungal agents against the mentioned yeasts was obtained; the M. F. C., in a solid medium, was also obtained. The antifungal dilutions (factor 2) included between 0.0030 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the culture medium were tested. The most efficient antifungal agent was aureofungin, having an average M.I.C. of 0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all the strains, followed by hamicin (0.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bradosol (0.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$), trichomycin (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nystatin (1.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$), amphotericin B (2.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pimaricin (2.57 $\mu\text{g}/\text{ml}$), miconazole (6.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ectimar (13.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$), clotrimazole (24.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5-fluorocytosine (39.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$); actidione and pyrrolnitrin inhibited the development or growth of very few strains, and griséofulvin and tolnaftate had no inhibitory action.

In general, the most resistant species were *C. ciferrii* and *C. ravautii*, followed by *C. pseudotropicalis*.

The M. F. C. oscillated from values similar to the M. I. C. up to 128 times higher, as it exceptionally happened with hamicin on *C. ravautii*. However, the most frequent cases were those in which the M.F.C. was similar to the inhibitory one, followed by those in which it was only 2 and 4 times higher.

7. AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar público agradecimiento, en primer lugar, a nuestro hermano, Prof. Dr. D. Benito Aller Gancedo, por su transcendental y continua ayuda al proporcionarnos el tema de trabajo, llevar en todo momento la dirección del mismo y su posterior corrección.

Al Dr. D. Máximo Fernández Díez, valioso colaborador en el desarrollo y realización final del trabajo.

Al Prof. Dr. D. Miguel Cordero del Campillo, Director del Departamento de Patología infecciosa y parasitaria.

Al Dr. D. José Manuel Gonzalo Cordero, que nos proporcionó la mayor parte de las explotaciones en que se recogieron las muestras. Igualmente a los veterinarios D. Leopoldo González Hortal, D. Emilio García y D. Joaquín Díaz, así como a la Estación Agrícola Experimental, por idénticas razones.

A las diferentes casas comerciales que gratuitamente nos han enviado los antifúngicos ensayados.

Por último, a todos los componentes del Dpto. de Patología infecciosa y parasitaria, por su desinteresada colaboración siempre que fue necesaria.

8. BIBLIOGRAFIA

ADRIANO, S. M. y SCHWARZ, J. (1955). Experimental moniliasis in mice. *Am. J. Path.*, **31**, 859-873.

AGUERO, O. y FEO, M. (1963). Candidiasis vaginal y embarazo. *Revta Obst. Gin. Venezuela*, **23**, 95-117.

AINSWORTH, G. C. y AUSTWICK, P. K. C. (1973). *Fungal Diseases of Animals*. 2nd ed. Rev. Series NO. 6, Commonwealth Bureau of Animal Health, Farnham Royal, Slough, England.

AL-DOORY, Y. (1967). The mycoflora of the subhuman primates. I. The flora of the oral cavity of the Baboon in captivity. *Mycopath. Mycol. appl.*, **31**, 43-48.

AL-DOORY, Y., KALTER, S. S. y FREDERICKSON, M. (1967). The mycoflora of the subhuman primates. II. The flora of the rectum and vagina of the Baboon in captivity. *Mycopath. Mycol. appl.*, **31**, 332-336.

ALTERAS, I. y GAVRILOSCU, M. (1966). Nouvelles méthodes d'identification rapide du *Candida albicans*. *Revue Derm. Venerol.*, **11**, 42-47.

ALTERAS, I., COJOCARU, I. y WOLKONSKY, AI. (1968). In legătura cu eficacitatea nouui antibiotic antifungic «Pimaricin». *Derm. Venerol. (Bucuresti)*, **13**, 123-130.

APARICIO GARRIDO, J. y PEÑA YÁNEZ, J. (1959). Técnicas para el aislamiento de las monilias. En Coloquio sobre *Las Candidiasis Humanas*. Edit. «Iquinosa», Madrid, 65-76.

ARIMA, K., IMANAKA, H., KOSAKA, M., FUKUDA, A. y TAMURA, G. (1965). I. Studies on Pyrrolnitrin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of Pyrrolnitrin. *J. Antibiot., Tokyo*, **18**, 201-204.

ATHAR, M. A. (1971). «In vitro» susceptibility and resistance of *Candida* spp. to hamycin. *Sabouraudia*, **9**, 256-262.

AUSTWICK, P. K. C. y VENN, J. A. J. (1957). Routine investigations into mycotic abortion. *Vet. Rec.*, **69**, 488-491.

BARNETT, J. A. y PANKHURST, R. J. (1974). *A new key to the yeasts*. North-Holland Publ. Co. Amsterdam-London.

BENDIXEN, H. C. y PLUM, N. (1929). Schimmelpilze (*Aspergillus fumigatus* und *Absidia ramosa*) als Abortursache beim Rinde. *Acta path. microbiol. scand.*, **6**, 252-322.

BETINA, V., DROUHET, E. y SEGRETAIN, G. (1965). Action de la cyanéine «in vitro» sur des champignons pathogènes. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, **109**, 933-942.

BICHEL, J. y STENDERUP, A. (1955). Experimental investigations on the effect of monilia (*Candida albicans*) on lymphopoiesis in mice (I.). *Acta path. microbiol. scand.*, **37**, 157-162.

BISPING, W. (1963). Untersuchungen über die Ätiologie von Sprosspilzinfektionen bei Haustieren. *Zentbl. Vet. Med. Reihe B*, **10**, 325-361.

BLANK, H. y ROTH F. J. (1959). The treatment of dermatomycoses with orally administered griseofulvin. *Archs Derm., Chicago*, **79**, 259-266.

BODENHOFF, J. (1971). A new antimycotic from Bayer AG, Bay b 5097. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, **79**, 345-348.

BURGESS, M. A. y BODEY, G. P. (1972). Clotrimazole (Bay b 5097): «in vitro» and clinical pharmacological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 423-426.

CARETTA, G. y FURESZ, S. (1958). Azione della tricomicina e della nistatina sulle *Candidae* e sul *Trichomonas vaginalis*. *G. Malatt. Infett. Parass.*, **10**, 742-744.

CARLONE, N. A. y SCANNERINI, S. (1974). Scanning and transmission electron microscopy evidence of the cytological effect of pyrrolnitrin on *Microsporon audouinii* Gruby CBS 313-54 «in vitro». *Mycopath. Mycol. appl.*, **53**, 111-123.

CARLSON, J. R. y SNYDER, J. W. (1959). *Candida albicans* plate assay of nystatin. *Antib. Chemother.*, **9**, 139-144.

CARTER, B., JONES, C. P., ROSS, R. A., THOMAS, W. L. y DURHAM, N. C. (1940). Vulvovaginal mycoses in pregnancy. With the relation of symptoms to genera and species of fungi. *Am. J. Obst. Gynec.*, **39**, 213-226.

CATALFOVO, P. y SCHULTZ, H. W. (1966). Small tube method for the evaluation of antifungal and antibacterial activity. *J. Pharm. Sci.*, **55**, 117-119.

CLAYTON, Y. M. y CONNOR, B. L. (1973). Comparison of Clotrimazole cream, Whitfield's ointment and Nystatin ointment for the topical treatment of ringworm infections, pityriasis versicolor, erythrasma and candidiasis. *Br. J. Dermat.*, **89**, 297-303.

CHO, N., SAITO, T., FUKADA, M., SATO, I., KURAKATA, H. y MATSHASHI, K. (1974). Clinical studies on clotrimazole as antifungal therapy in obstetrics and gynaecology. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2**, 1-6.

DAVIS, B. A. (1969). Vaginal moniliasis in private practice. *Obstet. Gynecol.*, **34**, 40-45.

DAWKINS, S. M., EDWARDS, J. M. B. y RIDDELL, R. W. (1953). Yeast in the vaginal flora, their incidence and importance. *Lancet*, **2**, 1230-1235.

DECUN, M. y ROST, M. (1973). Cercetări privind microflora secrețiilor cervicale normale și patologice la taurine. *Reita. Zooteh. Med. Veterinări*, **23**, 39-46.

DOUPAGNE, P. (1960). Identification de 113 souches de *Candida*. Le Levine E.M.B.A., milieu idéal d'identification de *Candida albicans* en pays chaud. *Annls soc. belge Méd. trop.*, **40**, 893-897.

DROUHET, E. (1955). Action de la nystatine (fungicide) «in vitro» et «in vivo» sur *Candida albicans* et autres champignons levuriformes. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, **88**, 298-314.

DROUHET, E. (1965). Etude expérimentale d'un nouvel antibiotique antifongique, la pimaricine. *Bull. Dermat.*, **72**, 249-253.

DROUHET, E. y MILLE COUTEAU, M. (1954). Sur determination des Candidas. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, **86**, 602-617.

EUZEBI, J. (1969). *Cours de Mycologie Médicale Comparée. Les mycoses des animaux et leurs relations avec les mycoses de l'homme*. Vigot Frères-Edit., Paris.

FEGLER, F., BIESS, B. y NOLTING, S. (1966). Pimaricin: A new broad-spectrum mycostatic antibiotic. *Germ. med. Moth.*, **11**, 155-158.

FERNÁNDEZ-DÍEZ, M., ALLER-GANCEDO, J. M. y ALLER, B. (1974). Patogenicidad experimental para el ratón de *Torulopsis glabrata* y diversas especies del género *Candida*. *Revta ibér. Parasit.*, **34**, 283-293.

FRAGNER, P. (1972). Úkaz snižování citlivosti demratofytu na griseofulvinu y dalších generacích «in vitro». *Československá Dermat.*, **47**, 160-163.

FREITAS, D. C., LACERDA, P. y LACERDA, J. (1960-62). Estudo bacteriológico de infecções genitais de éguas puro sangue inglês. *Rta. Fac. Med. Vet. S. Paulo*, **6**, 393-399.

FRIEDRICH, E. y BOHME, H. (1974). Zum Wachstum von Sprosspilzen auf actidion-haltigen Nahrböden. *Mykosen*, **17**, 191-198.

GHOSH, A. y GHOSH, J. J. (1963). Effect of nystatin and amphotericin B on the growth of *Candida albicans*. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, **23**, 29-44.

GILLESPIE, H. L., INMON, W. B. y SLEATER, V. (1960). Incidence of *Candida* in the vagina during pregnancy. Study utilizing the Pagano-Levin culture medium. *Obstet. Gynecol.*, **16**, 185-188.

GODEFROI, E. F., HEERES, J., VAN CUTSEM, J. y JANSEN, P. A. J. (1969). The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenethylimidazole. *Jl. Medic. Chem.*, **12**, 784-791.

GOLD, W., STOUT, H. A., PAGANO, J. F. y DONOVICK, R. (1955-1956). Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. I. In Vitro studies. *Antibiotics A., 1955-1956*, 579-586.

GOLDSTEIN, E., GRIEGO, M. H., FINKEL, G. y LOURIA, D. B. (1965). Studies on the pathogenesis of experimental *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii* infections in mice. *J. Infect. Dis.*, **115**, 293-302.

GOLVAN, Y. J. y DROUHET, E. (1972). *Techniques en Parasitologie et en Micologie*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

GONZALEZ-OCHOA, A. y GARCÍA RAMOS, E. (1963). Frecuencia de monilias y moniliasis en vagina: influencia de la antibioterapia. *Rta. Inst. Salubr. Enferm. trop. (Méx.)*, **23**, 87-94.

GORDEE, R. S. y MATTHEWS, T. R. (1967). Evaluation of the «in vitro» and «in vivo» antifungal activity of Pyrrolnitrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 378-387.

GORDEE, R. S. y MATTHEWS, T. R. (1969). Systemic antifungal activity of Pyrrolnitrin. *Appl. Microbiol.*, **17**, 690-694.

GRACÍA JOVER, S., MEJÍAS RAMÍREZ, F. y ARAÚJO DE PÉREZ, C. (1967). Acción «in vitro» del tolnaftato sobre diversos hongos. *Acta méd. Venezolana*, **14**, 114-120.

GRASSET, M. M., SENEZE, J. y GAUTHIER, R. (1954). Contribution à l'étude des mycoses vulvo-vaginales. *Bull. Féd. Soc. Gyn. Obst.*, **6**, 181-185.

GRUPPER, C. y AVRAM, A. (1974). «In vitro» tests of the antibacterial and antifungal activity of miconazole. *Excerpta Med. Intern. Congr. Series*, **Nº 289**, 755.

HAJSIG, M. (1966). Istraživanja odnosa nekih kvasnica i bakterija izoliranih iz genitalnih organa krava. *Vet. Arh.*, **36**, 231-233.

HAJSIG, M. y SETINSKI, Z. (1963). Kvasnice i njima slične gljivice u genitalnim organima krava i junice. II. Istraživanja na poljoprivrednim dobrima i u seljačkim uzgojima. *Vet. Arh.*, **33**, 192-195.

HAJSIG, M. y TOPOJKO, S. (1967). Kvasnice i njima slične gljivice u genitalnim organima krava i junice. V. Genitalna kandidoza i pobačaji uzrokovani pripadnicima roda *Candida*, *Trichosporon* i *Saccharomyces*. *Vet. Arh.*, **37**, 193-196.

HAJSIG, M., HERAK, M. y VRBANAC, I. (1974). *Torulopsis glabrata* u genitalnim organima jalovih krmača i prikaz poznavanja te gljivice, napose kao uzročnika mikoze u ljudi i životinja. *Vet. Arh.*, **44**, 34-38.

HAJSIG, M., KOPILJAR, M. y LUKACEVIC, J. (1968). Investigations on the fungal flora in the genital organs of domestic male reproductors. II. Experimental infections of the yeast *Hansenula anomala* isolated from bull semen. *Vet. Arh.*, **38**, 287-289.

HAJSIG, M., KOPILJAR, M. y STEFICIC, M. (1964). Kvasnice i njima slične gljivice u genitalnim organima krava i junice. III. Eksperimentalna genitalna kandidijaza. *Vet. Arh.*, **34**, 133-137.

HAJSIG, M., SETINSKI, Z. y TOPOJKO, S. (1962). Kvasnice i njima slične gljivice u genitalnim organima krava i junice. I. Istraživanja na klaoničkom materijalu. *Vet. Arh.*, **32**, 232-236.

HALDE, C. y ARAGON, G. T. (1956). The incidence of yeastlike organisms in the lower genital tract of pregnant filipino women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **72**, 363-366.

HALDE, C., NEWCOMER, V. D., WRIGHT, E. T. y STERNBERG, T. H. (1957). An evaluation of amphotericin B «in vitro» and «in vivo» in mice against *Coccidioides immitis* and *Candida albicans*, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man. *J. invest. Derm.*, **28**, 217-232.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. (1972). A comparative «in vitro» study of amphotericin B, clotrimazole and 5-fluorocytosine against clinically isolated yeasts. *Sabouraudia*, **10**, 276-283.

HASENCLEVER, H. F. (1959). Comparative pathogenicity of *Candida albicans* for mice and rabbits. *J. Bact.*, **78**, 105-109.

HASENCLEVER, H. F. y MITCHELL, W. O. (1961). Production in mice of tolerance to the toxic manifestations of *Candida albicans*. *J. Bact.*, **84**, 402-409.

HAZEN, E. L. y BROWN, R. (1951). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **76**, 93-97.

HEJZLAR, M. y VYMOLA, (1970). Comparative study of pimaricin and fungicidin activity «in vitro». *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun.*, **14**, 211-213.

HERREL, W. E. (1971). The antifungal activity of 5-fluorocytosine. *Clinical Med.*, **78**, 11-13.

HILLMAN, R. B. (1969). Bovine mycotic placentitis in New York State. *Cornell Vet.*, **59**, 269-288.

HOLM, H. W. y MARWIN, R. M. (1967). Effects of surface active agents on the susceptibility of swiss mice to *Candida albicans*. *Mycopath. Mycol. appl.*, **33**, 186-192.

HOLT, R. J. y NEWMAN, R. L. (1972). Laboratory assessment of the actinomycotic drug clotrimazole. *J. clin. Path.*, **25**, 1089-1097.

HOSOYA, S., SOEDA, M., KAMATSU, N., IMAMURA, K.S., OKADA, K., NAKAZAWA, S. y YAMAGUCHI, T. (1955). Trichomycin, ein neues Antibioticum aus *Streptomyces hachijoensis* mit trichomonadicider und antibiotischer Wirksamkeit. *Aerztl. Forsch.*, **9**, 46-49.

HOWARTH, W. R., TEWARI, R. P. y SOLOTOROVSKY, M. (1975). Comparative «in vitro» antifungal activity of Amphotericin B and Amphotericin B methyl ester. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**, 58-63.

HURLEY, R. (1965). The pathogenicity of *Candida stellatoidea*. *J. Path. Bact.*, **90**, 351-354.

HURLEY, R. (1966 a). Experimental infection with *Candida albicans* in modified hosts. *J. Path. Bact.*, **92**, 57-67.

HURLEY, R. (1966 b). Effect of route of entry of *Candida albicans* on the histogenesis of the lesions in experimental candidosis in the mouse. *J. Path. Bact.*, **92**, 578-583.

HURLEY, R. y MORRIS, E. D. (1964). The pathogenicity of *Candida* species in the human vagina. *J. Obstet. Gynecol.*, **71**, 692-695.

HURLEY, R. y WINNER, H. I. (1962). The pathogenicity of *Candida tropicalis*. *J. Path. Bact.*, **84**, 33-38.

HURLEY, R. y WINNER, H. I. (1963). Experimental renal moniliasis in the mouse. *J. Path. Bact.*, **86**, 75-82.

HURLEY, R. y WINNER, H. I. (1964). Pathogenicity in the genus *Candida*. *Mycopath. Mycol. appl.*, **24**, 337-346.

IMANAKA, H., KOUSAKA, M., TAMUR, G. y ARIMA, K. (1965). Studies on Pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. Taxonomic studies on Pyrrolnitrin-producing strain. *J. Antibiot. Tokyo*, **18**, 205-206.

IWATA, K., YAMAGUCHI, H. y HIRATANI, T. (1973). Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia*, **11**, 158-166.

JACKSON, J. L. (1956). The incidence of *Candida* in obstetrical patients. *Am. J. Obst. Gynec.*, **72**, 648-651.

JASKOSKI, B. I. y THOMPSON, M. B. (1967). «In vitro» activity of Tolnaftate. *J. Am. Pediat. Assoc.*, **57**, 273-274.

JORGENSEN, A. y HANSEN, A. (1959). *Microbiología de las fermentaciones industriales* 7.^a ed. Edit. Acribia, Zaragoza.

JUNGERMAN, P. F. y SCHWARTZMAN, R. M. (1972). *Veterinary Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

KNUDSTON, W. U., WOHLGEMUTH, K., KIRKBRIDE, C., ROBL, M. y KIEFFER, M. (1973). Pathogenicity of *Torulopsis glabrata* for pregnant mice. *Sabouraudia*, **11**, 175-178.

KOPIJAR, M., HAJSIG, M. y STRAHOVNA, E. (1972). On the role of yeasts in the pathogenesis of experimental genital pyobacillosis in cattle. *Vet. Arh.*, **42**, 153-157.

KOPIJAR, M., HAJSIG, M., STRAHOVNA, E. y ZIGER, K. (1966). Kvasnice i njima slične gljivice u genitalnim organima krava i junice. IV. Pokusne infekcije junica s vrstama *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* i *Debaryomyces*. *Vet. Arh.*, **36**, 274-280.

KRABISCH, P. (1971). *Vorkommen von Mykoplasmen und Hefen auf Genitalschleimhäuten von Stuten*. Inaugural-Dissertation, Hannover.

KUEHN, H. H. y ORR, G. F. (1962). Tolerance of certain fungi to actidione and its use in isolation of Gymnoascaceae. *Sabouraudia*, **1**, 220-229.

KULL, F. C., EISMAN, P. C., SYLWESTROWICZ, H. D. y MAYER, R. L. (1961). Mixtures of quaternary ammonium compounds and long-chain fatty acids as antifungal agents. *Appl. Microbiol.*, **9**, 538-541.

KUTSCHER, A. H., SEGUIN, L., LEWIS, S., PIRO, J. D. y ZEGARELLI, E. V. (1954). Growth inhibiting properties of Phenoxy-ethyl-dimethyl-dodecyl-ammonium bromide (PDDB) (Bradosol) against *Candida albicans* «in vitro». *Antibiotics Chemother.*, **4**, 1045-1049.

KUTSCHER, A. H., SEGUIN, L., LEWIS, S., PIRO, J. D. y ZEGARELLI, E. V. (1956). Fungicidal properties of Phenoxy-ethyl-dimethyl-dodecyl-ammonium Bromide (PDDB) against *Candida albicans* «in vitro». II. *Antibiotic Chemother.*, **6**, 400-403.

LACAZ, C. S. y UISON, C. (1958). Ação «in vitro» da trichomicina (cabamicina) sobre leveduras. *Rivta. lat.-amer. Microbiol.*, **1**, 215-224.

LACERDA, P., FREITAS, D. y ZANI, L. (1954). Observações preliminares sobre a flora bacteriana das metrites bovinas. *Rivta. Fac. Med. Vet. S. Paulo*, **5**, 73-76.

LAMBOTTE, R. (1960). Activité de divers antibiotiques sur *Candida albicans* et *Trichomonas vaginalis*. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **54**, 1.113-1.114.

LASKIN, A. I. y LÉCHEVALIER, H. (1973). *Handbook of Microbiology*. Vol. III. *Microbial Products*. C.R.C. Press., Cleveland.

LEACH, B. E., FORD, J. H. y WHIFFEN, A. (1947). Actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*. *J. Am. chem. Soc.*, **69**, 474.

LITTMAN, M. L., PISANO, M. A. y LANCASTER, R. (1958). Induced resistance of *Candida* species to nystatin and amphotericin B. *Antibiotics A.*, **1957-1958**, 981-987.

LODDER, J. edit. (1970). *The yeasts. A taxonomic study*. 2nd ed. North-Holland Publ. Co. Amsterdam-London.

LODDER, J. y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (1967). *The yeasts. A Taxonomic study*. North-Holland Publ. Co. Amsterdam.

LONES, G. W. y PEACOCK, C. L. (1959). Alterations in *Candida albicans* during growth in the presence of Amphotericin B. *Antibiotics Chemother.*, **9**, 535-540.

LÓPEZ GRACIA, J. (1972). Actividad antifúngica de la 5-fluorocitosina. *Rivta. Clín. Esp.*, **127**, 1017-1020.

LOURIA, D. B. (1965). Pathogenesis of Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1965**, 417-426.

LOURIA, D. B., BRAYTON, R. G. y FINKEL, G. (1963). Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infections in mice. *Sabouraudia*, **2**, 271-283.

LU, Y. C. (1971). «In vitro» study of pyrrolnitrin. *J. Formosan Med. Assoc.*, **70**, 449-452.

LUKACEVIC, J., HAJSIG, M. y MILAKOVIC, L. (1963). Istraživanja gljivične flore genitalnih organa domaćih raspolodnjaka. I. Kvasnice i njima slične gljivice iz prepucija bikova. *Vet. Arh.*, **33**, 267-270.

LYSENKO, I. P. y MOLORADOVICH, A. F. *Candida* species as aetiological agents of abortion in animals. *Veterinariya, Kiev*, **1966**, 133-140. (en ruso).

LUTZ, A. y WITZ, A. (1957). L'action comparée «in vitro» de la nystatine et de la trichomycine sur des champignons levuriformes du genre *Candida* provenant de vulvo-vaginites. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, **92**, 272-276.

MACKENZIE, D. W. R. (1962). Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. clin. Path.*, **15**, 563-565.

MAGARA, M., YOKOYAMA, E., SENDA, T. y AMINO, E. (1954). The action of a new antibiotic, Trichomycin, upon *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* and anaerobic bacteria. *Antibiotics Chemother.*, **4**, 433-438.

MAHGOUB, E.S. (1972). Laboratory and clinical experience with clotrimazole (BAY b 5097). *Sabouraudia*, **10**, 212-217.

MALICKA, E. (1969). Występowanie flory grzybiczej w pochwie suk i jej wpływ na błonę śluzową pochwy. *Medycyna wet.*, **25**, 501-503.

MANERO MARTÍNEZ, S. (1972). Flora levaduriforme de la vagina humana durante el embarazo. *An. Fac. Vet. León*, **18**, 53-94.

MANIAR, A. C. (1966). Biological activities of hamycin. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 377-384.

MANKOWSKI, Z. T. (1957). The experimental pathogenicity of various species of *Candida* in swiss mice. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **19**, 548-570.

MARKS, M. I. y EICKHOFF, T. C. (1970). Application of four methods to the study of the susceptibility of yeast to 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1970**, 491-493.

MARKS, M. I., STEER, P. y EICKHOFF, T. C. (1971). «In vitro» sensitivity of *Torulopsis glabrata* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, and clotrimazole (Bay 5097). *Appl. Microbiol.*, **22**, 93-95.

MEDOFF, G., COMFORT, M. y KOBAYASHI, G. S. (1971). Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **138**, 571-574.

MOHR, J. A., TATEM, B. A., LONG, H., MUCHMORE, H. G. y FELTON, F. G. (1973). Increased susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B in the presence of steroids. *Sabouraudia*, **11**, 140-142.

MORENO, G., BICUDO, P. L. y LOPEZ, C.C.A.M. (1973). Aspectos bacteriológicos da flora vaginal de cadelas. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, **40**, 59-62.

MOURAD, S. y FRIEDMAN, L. (1961). Pathogenicity of *Candida*. *J. Bact.*, **81**, 550-556.

NEGRÓN, R. (1966). La sensibilidad «in vitro» de *Torulopsis glabrata*. *An. Soc. cient. Argentina*, **182**, 43-50.

NISHIDA, M., MATSUBARA, T. y WATANABE, N. (1965). Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic. Microbiological and toxicological observations. *J. Antibiot., Tokyo*, **18**, 211-219.

NOLLIN, S. y BORGERS, M. (1974). The ultrastructure of *Candida albicans* after «in vitro» treatment with miconazole. *Sabouraudia*, **12**, 341-351.

NORMARK, S. y SCHONEBECK, J. (1972). «In vitro» studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 114-121.

NOSE, M. y ARIMA, K. (1969). On the mode of action of a new antifungal antibiotic, pyrrolnitrin. *J. Antibiot., Tokyo*, **22**, 135-143.

NUNN, W. R. (1970). Observations on the bacteriology of the genital tracts of infertile cows in Ireland. *Ir. vet. J.*, **24**, 181-188.

O'GRADY, F., THOMPSON, R.E.M. y COTTON, R.E. (1963). The effect of griseofulvin on *Candida albicans* lesions in mice. *Brit. J. exp. Path.*, **44**, 334-338.

OTCENASEK, M. y HUBALEK, Z. (1968). «In vitro» antifungal activity of amphotericin B against *Emmonsia crescens*. *Sabouraudia*, **6**, 255-259.

PADHYE, A. A. (1969). «In vitro» sensitivity of human and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* to micronized hamycin. *Sabouraudia*, **7**, 182-185.

PANIKA, C. K. J., KURUP, P. V. y DEVI, K. I. (1963). Nystatin sensitivity of *Candida* strains. *Indian J. med. Res.*, **51**, 846-850.

PANSE, M. V. y NARAYAN, R. A. (1973). Comparative antifungal activity of hamycin against *Candida* strains complicating tuberculosis. *Hindustan Antibiotics Bull.*, **16**, 25-28.

PLEMPEL, M. y BARTMANN, K. (1972). Experimentelle Untersuchungen zur antimykotischen Wirkung von Clotrimazol «in vitro» und bei der lokaler Applikation «in vivo». *Arznl. Forsch.*, **22**, 1280-1289.

PLEMPEL, M. y BOSHAGEN, H. (1968). Estudios experimentales sobre un nuevo fungicida: Bay Va 5387, hidrocloruro de 3-etylaminoo-1, 2-benzoisotiazol. *Notic. Med. Veter.*, **4**, 267-280.

PLEMPEL, M., BARTMANN, K., BUCHEL, H. y REGEL, E. (1969). Experimentelle Befunde über ein neues, oral wirksames Antimykotikum mit breitem Wirkungsspektrum. *Dtsch. med. Wschr.*, **94**, 1356-1358.

POREBSKA, A., ŁASKOWICKA, Z. y ZEMBRUOWA, K. (1971). Fungistatic activity «in vitro» of a new antibiotic-pimaricin (natamycin). *Medycyna Dosic. Mikrob.*, **23**, 71-76. (en ruso).

PREAC-MURSIC, V. (1972). Pathogene Heter in klinischem Untersuchungsmaterial. Nachweis, Differenzierung und Empfindlichkeitsbestimmung. *Münchener med. Wschr.*, **114**, 1520-1523.

QUADRAS-BORDES, M. L. y QUADRAS-BORDES, M. V. (1959).—Candidiasis o moniliasis vulvovaginal. *Clin. Laborat.*, **68**, 271-277.

QUINN, L. Y., WILBUR, R. D. y CATRON, D. V. (1960). «In vitro» response of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* to antifungal agents. *Antibiotics Chemother.*, **10**, 95-100.

RAAB, W. (1969). Pimaricin (natamycin) an antifungal, antitrichomonad antibiotic. *Clin. Trials J.*, **6**, 45-54.

RAMANANDA RAO, G. y SIRSI, M. (1962). The pathogenicity of *Candida albicans* and the effect of nystatin on experimental candidiasis. *Indian J. med. Res.*, **50**, 66-72.

RAMANANDA RAO, G. y SIRSI, M. (1964). Studies on the genus *Candida*. Part 1. Phatogenicity and susceptibility to antifungal antibiotics of some species in the genus *Candida*. *Indian J. med. Res.*, **52**, 75-80.

RAMÍREZ, C. (1974). A compilation of descriptions of new *Candida* species with keys to all species of the genus described up to date. *Microbiol. Espan.*, **27**, 15-78.

REFAI, M. (1973). Miconazol-Nitrat, ein neues Breitspektrum-Antimykotikum für die Lokalbehandlung von Dermatomykosen. I. Die Wirkung «in vitro» gegen Pilze und Bakterien. *Mykosen*, **16**, 39.

REICH, W. J. y NECHTOW, M. J. (1949). Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. *J. Am. med. Ass.*, **141**, 991-992.

REY, M. (1972). Incidencia de levaduras en la leche de abasto de la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*, **18**, 95-150.

REY, M., FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. y ALLER, B. (1973). Patogenicidad para el ratón de *Candida albicans* de origen humano y bovino, por inyección intravenosa. *Microbiol. Espan.*, **26**, 179-187.

RITTERFELD, W. y WEISBROD, W. (1972). Antimykotische Wirkung von Chlortriptylimidazol auf *Candida* und *Cryptococcus neoformans*. *Arznl. Forsch.*, **22**, 2073-2075.

RIET, J. (1971). The fungicidal activity of the preparation ectimar (Bay Va 5387) on strain of chromogenic fungi isolated from wool fleeces contaminated with «amarillo infeccioso» (infective yellow). *Vet. med. Rev.*, **4**, 481-488.

ROB, O. y TOMAN, J. (1970). Frekvence výskytu plísní ve spermatu a předkožkovém vaku plemených býků. *Vet. Med., Praha*, **15**, 703-708.

ROBINSON, H. M. (1964). *Tolnaftate, experimental and clinical studies*. 4th Intersec. Conf. Antimic. Agents & Chemother., N. Y., Oct.

ROTH, F. J., SALIMAN, B. y BLANK, H. (1959). «In vitro» studies of the antifungal antibiotic griseofulvin. *J. invest. Derm.*, **33**, 403-418.

SÁEZ, H. (1965). *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolé chez l'animal. Analyse portant sur quatre années de recherches. *Annls Parasit. hum. comp.*, **40**, 105-118.

SALKIN, I. F. y HURD, N. (1971). A quantitative analysis of the antifungal properties of cicloheximide. *V.º Cong. Soc. Int. Mycol. Hum. Anim., París*, 287-288.

SCHIEFER, B. y MEHNERT, B. (1967). Verhalten verschiedener Hefarten im Gewebe nach parenteraler Applikation an Mäuse. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, 1 Orig.*, **202**, 233-247.

SCHOLER, H. J. (1970). Antimykoticum 5-Fluorocytosin. *mykosen*, **13**, 179-188.

SCHONEBECK, J. y ANSEHN, S. (1973). 5-fluorocytosine resistance in *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*. *Sabouraudia*, **11**, 10-20.

SEIGA, K., YAMAJI, K. y SUGIYAMA, Y. (1973). Symtomatology and chemotherapy of nonspecific vaginitis. *Asian Med. J.*, **16**, 45-64.

SHADOMY, S. (1969). «In vitro» studies with 5-fluorocytosine. *Appl. Microbiol.*, **17**, 871-877.

SHADOMY, S. (1970). Further «in vitro» studies with 5-fluorocytosine. *Infect. Immun.*, **2**, 484-488.

SHADOMY, S. (1971 a). «In vitro» and «in vivo» studies with several new antifungal agents. *V.º Cong. Int. Mycol. Hum. Anim., París*, 291-292.

SHADOMY, S. (1971 b). «In vitro» antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097). *Infect. Immun.*, **4**, 143-148.

SHADOMY, S., KIRCHOFF, C. B. y INGROFF, A. E. (1973). «In Vitro» activity of 5-fluorocytosine against *Candida* and *Torulopsis* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**, 9-14.

SHADOMY, S., WAGNER, G., INGROFF, A. E. y DAVIS, B. A. (1975). «In vitro» studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 117-121.

SIKDER, A., SINGH, G., BANERJEE, M. C. y SHARMA, R.N. (1972). Isolation of *Candida pseudotropicalis* from cases of abortion among mares: a note. *Indian. J. Anim. Sci.*, **42**, 737-738.

SIMONE, L. (1966). Estudio comparativo de los medios de cultivo de las micosis en relación con las micosis genitales. *Acta Gin.*, **17**, 109-116.

SMITH, T. (1920). Mycosis of the bovine fetal membranes due to a mould of the genus *Mucor*. *J. exp. Med.*, **31**, 115-122.

SOLES, P., LIM, L. Y. y LOURIA, D. B. (1967). Active immunity in experimental candidiasis in mice. *Sabouraudia*, **5**, 315-322.

SONG, M. M. (1974). Experimental cryptococcosis of the skin. *Sabouraudia*, **12**, 133-137.

SREEDHARA SWAMY, K. H., SIRSI, M. y RAMANANDA RAO, G. (1974). Studies on the mechanism of action of miconazole: effect of miconazole on respiration and cell permeability of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**, 420-425.

STRUYK, A. P., DROSTE, G., HAISVISZ, J. M., VAN EEK, T. y HOOGERHUIDE, J. C. (1958). Pimarinicin, a new antifungal antibiotic. *Antibiotics A.*, **1957-1958**, 878-885.

TEBYAKINA, A. E. y CHAIKOVSKAYA, S. M. (1960). Obtaining *Candida* strains resistant to nystatin and their characteristic properties. *Antibiotiki*, **5**, 91-95. (en ruso).

THIRUMALACHAR, M. J. y PADHYE, A. A. (1965). Experimental blastomycosis treated orally with hamycin. *Sabouraudia*, **4**, 6-10.

THIRUMALACHAR, M. J., MENON, S. K. y BHATT, V. V. (1961). Hamycin, a new antifungal antibiotic. I. Discovery and biological studies. *Hindustan Antibiot. Bull.*, **3**, 136-138.

THIRUMALACHAR, M. J., RAHALKAR, P. W., STAKPURE, R. S. y GOPALKRISHNAN, K. S. (1964). Aureofungin, a new heptaene antibiotic. *Hindustan Antibiot. Bull.*, **6**, 108-111.

THIRUMALACHAR, M. J., SETHNA, S. B., RAHALKAR, P. W., WAGLE, A. P. y SUBRAMANYAM, A. (1972). «In vitro» activity of Hamycin with reference to its «in vivo» effect in treatment of systemic mycosis. *Hindustan Antibiot. Bull.*, **14**, 123-126.

TRIPATHI, R. K. y GOTTLIEB, D. (1966). Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J. Bact.*, **100**, 310-318.

TSYGANOV, V. A., KONEV, Y. E., FURSENKO, M. V., IOFFINA, E. I., ALBERT, M. M., MUSTAFOVA, N. N., VENKOVA, I. B., SOLOVIEV, S. N., MALYSHKINA, M. A., BOGDANOVA, N. P., KOTENKO, T. V. y FILIPPOVA, A. I. (1964). Vydelenie i kharakteristika aktinomitsetov, obrazuyushchikh antibiotik trihomitsin. *Antibiotiki*, **9**, 291-296.

TURNER, P. D. (1965). Association of fungi with bovine abortion in Hong Kong. *Vet. Rec.*, **77**, 273-276.

VAN CUTSEM, J. y THIENPONT, D. (1971). Experimental cutaneous *Candida albicans* infection in guinea-pigs. *Sabouraudia*, **9**, 17-20.

VAN CUTSEM, J. y THIENPONT, D. (1972). Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy*, **17**, 392-404.

VAN DEN BOSSCHE, H., WILLEMSSENS, G. y VAN CUTSEM, J. (1975). The action of Miconazole on the growth of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **13**, 63-73.

VAN UDEN, N. (1960). The occurrence of *Candida* and other yeasts in the intestinal tracts of animals. Part II. Epidemiology, Biochemistry, and Physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **89**, 59-68.

VAN UDEN, N., CARMO SOUSA, L. y FARINHA, M. (1958). On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J. gen. Microbiol.*, **19**, 435-445.

WALZ, J. A., MOSS, E. L. y WEINSTEIN, M. J. (1971). Chemotherapeutic evaluation of Clotrimazole (Bay b 5097, 1-(o-chloro- α - α diphenylbenzyl imidazole). *Appl. Microbiol.*, **22**, 891-898.

WAWRZKIEWICZ, K. (1973). Aktywnosc fungistatyczna nystatyny w zaleznosci od srodowiska i rozpuszczalnika. *Polske Arch. Weteryn.*, **16**, 85-94.

WAWRZKIEWICZ, K. y GALEZA, J. (1972). Flora grzybicza w narządach rodnych krow rzeznych i nasieniu buhajów. *Medycina wet.*, **28**, 424-426.

WEHRSPANN, P. (1971). Die *in vitro*-Empfindlichkeit der wichtigsten Sprosspilze gegen BAY b 5097. *mykosen*, **14**, 525-529.

WEINSTEIN, M. J., ODEN, E. M. y MOSS, E. (1964). Antifungal properties of Tolnaftate «in vitro» and «in vivo». *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1964**, 595-601.

WILDFEIER, A. (1972). Die pathogenität von Sprosspilzen im Tierexperiment. *mykosen*, **15**, 255-264.

WILDFEIER, A. (1973). The treatment of cutaneous candidiasis in rabbits. *Sabouraudia*, **11**, 4-9.

WINNER, H. I. y HURLEY, R. (1964). *Candida albicans*. J. & A. Churchill Ltd, London.

YOUNG, C. N. (1972). Sensitivity patterns to griseofulvin of *Trichophyton rubrum* and other ringworm fungi. *Trans. St. John's Hosp. Derm. Soc.*, **58**, 226-234.

ZVEREVA, G. V. y REPKO, A. N. (1968). Fungal contamination of bull semen. *Dokl. Akad. Nauk.*, **1968**, 23-35. (en ruso).

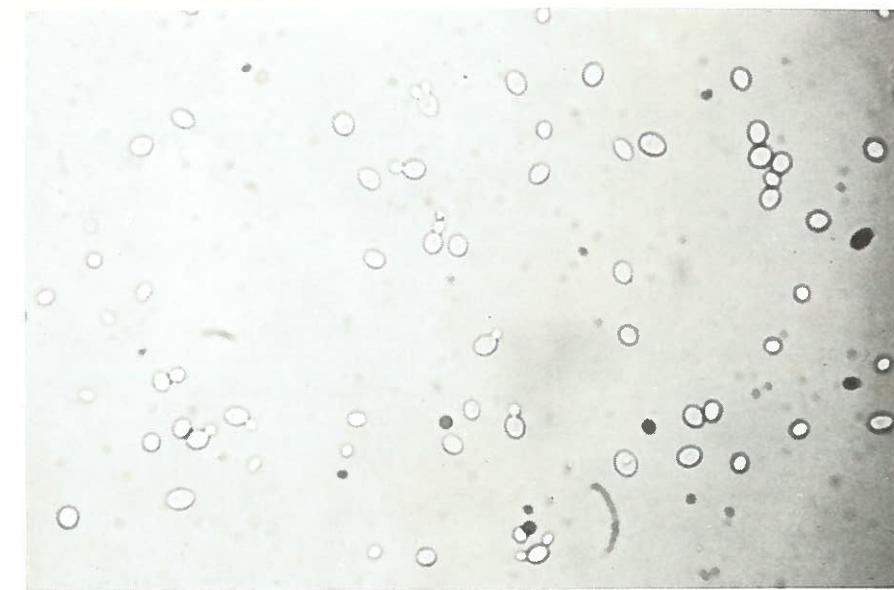


Fig. 1.-*Candida pseudotropicalis*, 400 X



Fig. 2.-*Candida krusei*, 400 X.

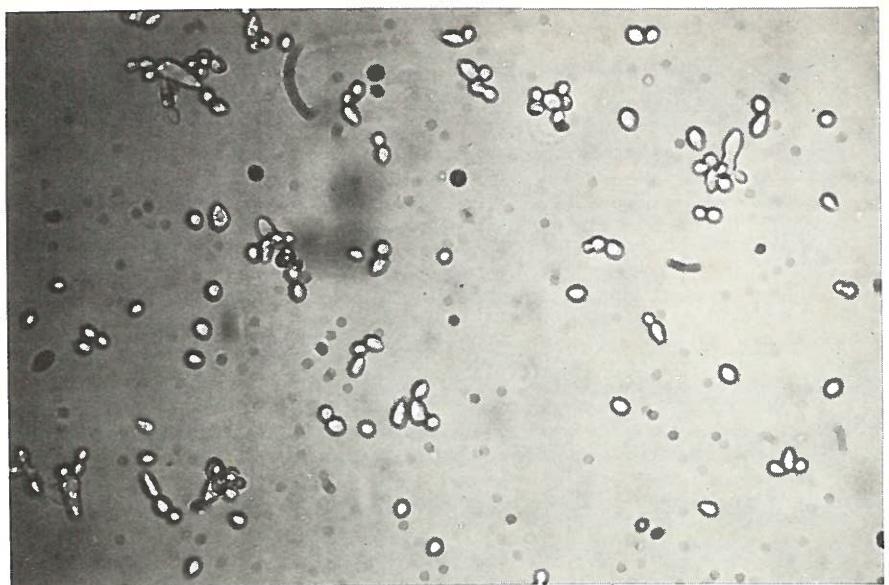


Fig. 3.—*Candida ciferrii*, 400 X.

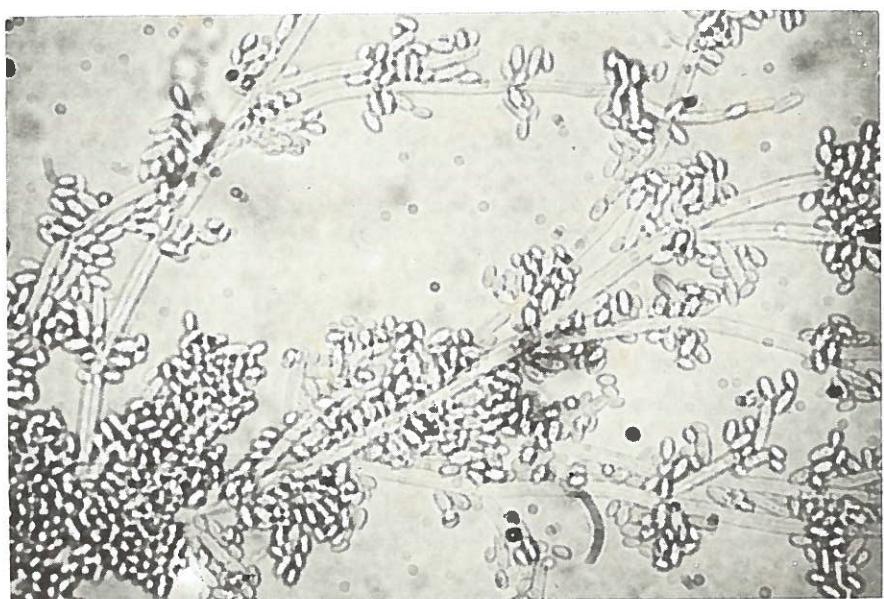


Fig. 4.—*Candida krusei*, pseudomicelio, 400 X.

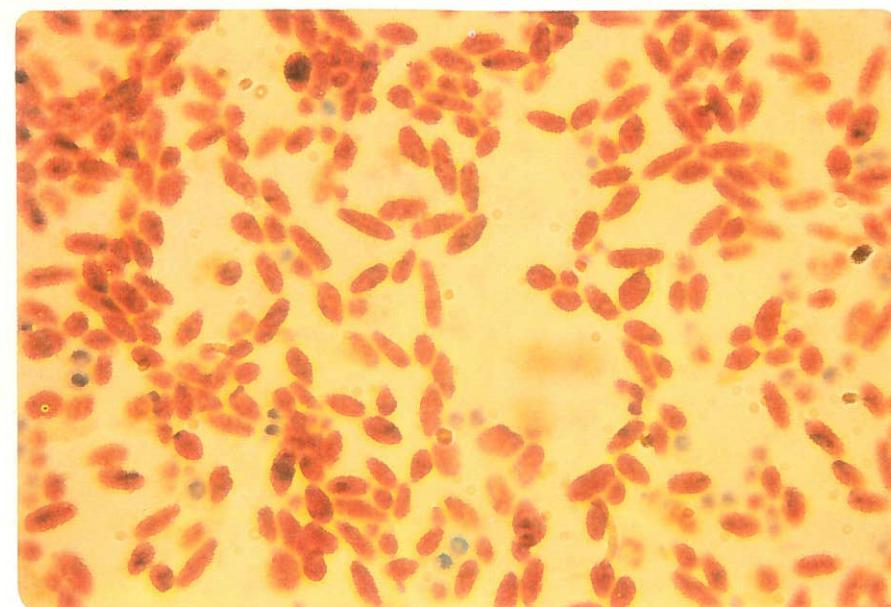


Fig. 5.—*Pichia membranaefaciens*, ascosporos, 1000 X.

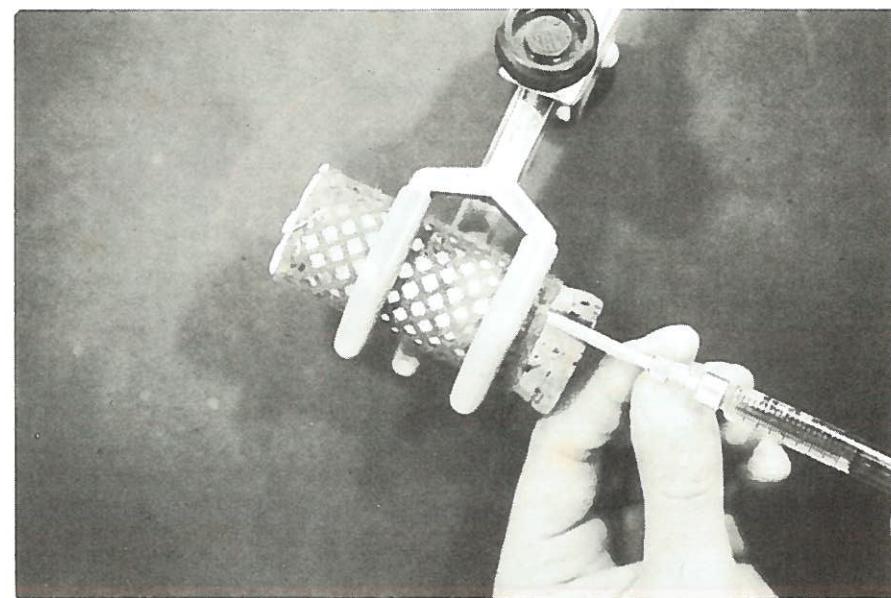


Fig. 6.—Inoculación en las venas laterales de la cola del ratón.

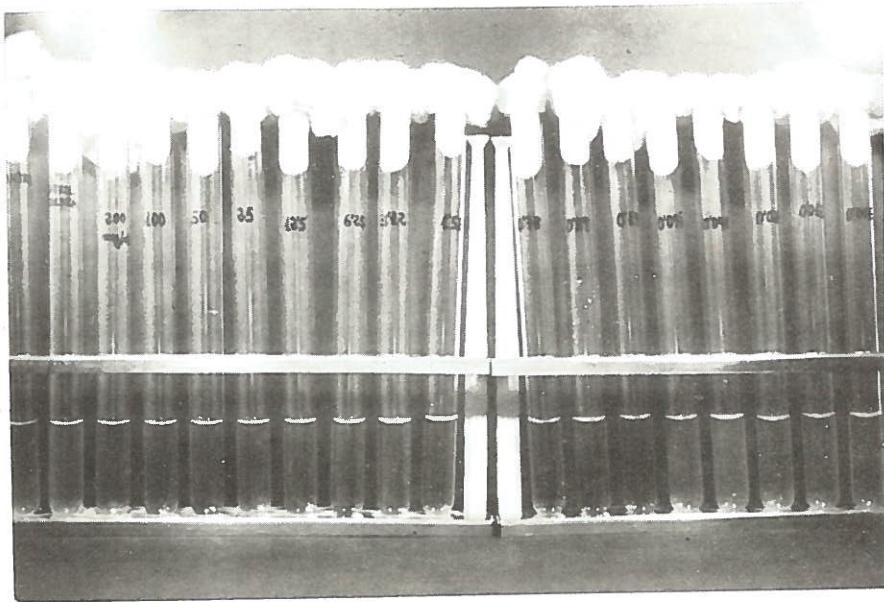


Fig. 7.-Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.).

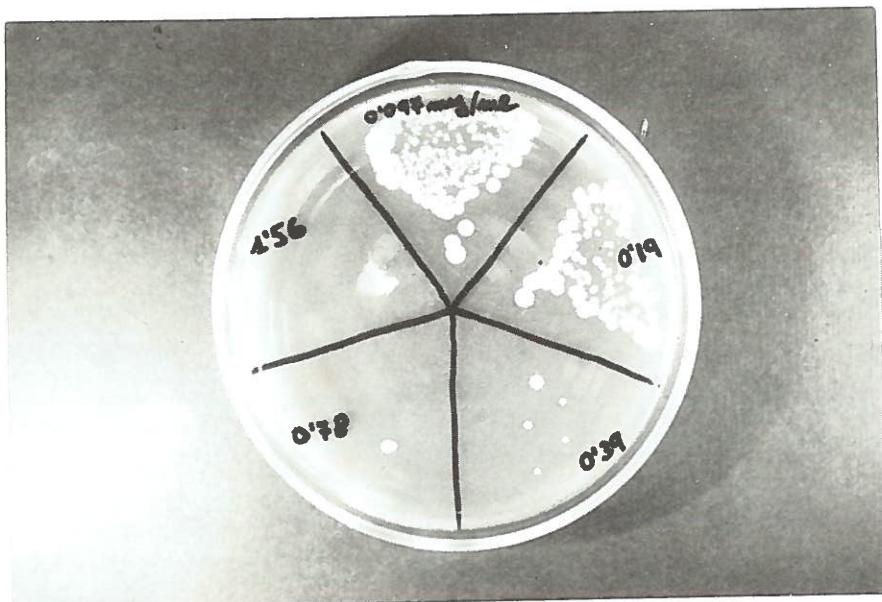


Fig. 8.-Concentración Mínima Fungicida (C.M.F.).