



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE *Candida dubliniensis*
MEDIANTE EL USO DE PRUEBAS
FENOTÍPICAS EN LA COLECCIÓN DE
MUESTRAS DEL HOSPITAL GENERAL DE
MEXICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO-BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ISRAEL RIVERA MARTÍNEZ



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA
MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2005



m. 349033



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

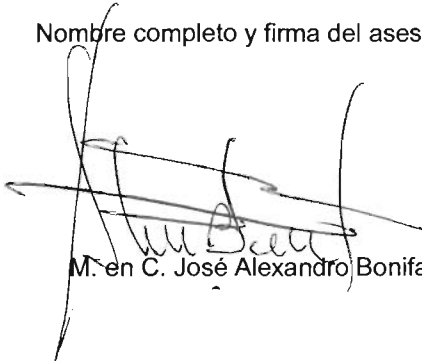
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Prof. José Alejandro Bonifaz Trujillo
Secretario	Prof. Misael González Ibarra
1er. Suplente	Prof. María del Carmen Urzua Hernández
2do. Suplente	Prof. Rosalía Esquivel Cote

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Micología, Servicio de Dermatología, Hospital General de México.

Nombre completo y firma del asesor del tema:



M. en C. José Alejandro Bonifaz Trujillo

Nombre completo y firma del sustentante o sustentantes:



Israel Rivera Martínez

DEDICATORIA:

- ❖ A mis padres, José Luis y María, por enseñarme que cada reto en la vida es pequeño si tienes fe y pones todo el esfuerzo por superarlo.
- ❖ A mis hermanos, Luis, Juan y Araceli, por apoyarme siempre y animarme a seguir adelante.
- ❖ A Verónica, por ser mi inspiración, conocerme y aceptarme a pesar de todo.
- ❖ A Jacqueline, por ser una amiga incondicional en todo momento.
- ❖ A la familia Zavala Zendejas, por escucharme y apoyarme en los momentos difíciles.
- ❖ A toda la gente linda que ha escuchado mis sueños y me anima a alcanzarlos.

AGRADECIMIENTOS:

- ❖ Al Prof. Alexandro Bonifaz, por creer en mi para iniciar esta aventura profesional y más que un maestro, ser un amigo.
- ❖ A todos los amigos de “La Oficina”, por compartir tantos momentos buenos y divertidos juntos.
- ❖ Al personal del Laboratorio de Micología del Hospital General de México, por enseñarme tantas cosas a nivel personal y profesional.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, por la maravillosa experiencia de haber estado en sus aulas y permitirme ser alguien en la vida.

“Si fallas puede ser que estés desilusionado, pero si no lo intentas estarás perdido...”

INDICE

1. Objetivos, 6
2. Hipótesis, 7
3. Introducción, 8
4. Antecedentes, 10
 - 4.1 *Candida dubliniensis*, 10
 - 4.2 Historia, 11
 - 4.3 La emergencia de *Candida dubliniensis*, 12
 - 4.4 Identificación de *C. dubliniensis* en especímenes clínicos, 14
 - 4.4.1 Características de *C. dubliniensis*, 14
 - 4.4.2 Pruebas fenotípicas, 17
 - 4.4.3 Pruebas genotípicas, 26
 - 4.4.4 Resistencia a antifúngicos, 28
5. Materiales y métodos, 31
 - 5.1 Cepas de referencia, 31
 - 5.1.1 Preservación de cepas de referencia, 31
 - 5.2 Cepas de trabajo, 32
 - 5.2.1 Obtención de cepas y almacenamiento, 32
 - 5.2.2 Reactivación de las cepas de trabajo, 33
 - 5.3 Metodología, 34
 - 5.3.1 Pruebas térmicas, 34
 - 5.3.2 Pruebas morfológicas, 35
 - 5.3.3 Pruebas cromogénicas, 36
6. Resultados, 37
 - 6.1 Pruebas térmicas, 39
 - 6.2 Pruebas morfológicas, 42
 - 6.3 Pruebas cromogénicas, 47
 - 6.4 Resultados globales, 52
7. Discusión, 54
8. Conclusiones, 65
9. Apéndice A (preparación de medios de cultivo), 68
10. Bibliografía, 69

IDENTIFICACIÓN DE *Candida dubliniensis*
MEDIANTE EL USO DE PRUEBAS FENOTÍPICAS
EN LA COLECCIÓN DE MUESTRAS DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO.

Objetivo general:

Evaluar la presencia de *Candida dubliniensis* como principal agente etiológico en las candidosis diagnosticadas en el Hospital General de México, mediante el uso exclusivo de pruebas fenotípicas.

Objetivos específicos:

- Utilizar pruebas fenotípicas reportadas a nivel internacional.
- Evaluar el grado de confiabilidad de estas pruebas para distinguir entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.
- Desarrollar metodología de utilidad para los laboratorios de microbiología médica para la identificación de estas especies
- Obtener datos estadísticos que sirvan para el desarrollo de reportes epidemiológicos en México.

Hipótesis general:

- Es posible distinguir e identificar a *Candida dubliniensis* de *Candida albicans* mediante pruebas fenotípicas.

Hipótesis nula:

- No es posible distinguir e identificar a *Candida dubliniensis* de *Candida albicans* mediante pruebas fenotípicas, sino que se requiere de pruebas genéticas.

III. INTRODUCCIÓN

Las candidosis son infecciones primarias o secundarias ocasionadas por miembros del género *Candida*, principalmente por *Candida albicans*. Las candidosis son las micosis más frecuentes y por ende las más estudiadas a nivel internacional.

A partir del año 1995 se empezó a reportar una nueva especie del género *Candida*, principalmente en candidosis muco-cutáneas en pacientes con VIH/SIDA que han recibido un tratamiento prolongado con fluconazol. Gracias a los trabajos de Sullivan y cols^(6, 7, 8, 11), esta levadura "emergente" hoy se conoce con el nombre de *Candida dubliniensis*, cuyas habilidades o características fundamentales son imitar, igualar o poseer prácticamente todas las características de *Candida albicans* que utilizamos para distinguirla de otras levaduras del mismo género.

Podríamos insinuar nemotécnicamente que *Candida dubliniensis* es una "hermana gemela" de *Candida albicans*, ya que las pruebas de ADN que se han hecho parecen demostrar que su genoma es diferente tan sólo en un 1.4 %^(8, 11), y además, son prácticamente indistinguibles una de la otra en las pruebas fenotípicas tradicionales usadas en la búsqueda de *Candida albicans*.

Esto trae como consecuencia, que esta "hermana gemela" no sea detectada desde un principio y por lo tanto nos lleva a dar un diagnóstico y un tratamiento incorrecto, del cual nos percatamos por fallas terapéuticas

En este momento, las pruebas más exactas para la identificación de esta nueva especie han sido las diversas técnicas de ADN que existen, sin embargo, tienen el inconveniente de ser y utilizar equipo costoso, además de que en nuestro país son pocas las instituciones que cuentan con el equipo y personal capacitado para desarrollar tales pruebas. De ahí la necesidad de buscar pruebas que nos

ayuden a dar un diagnóstico correcto, que sean económicas, y que sean fáciles de realizar en los laboratorios de microbiología médica de rutina en nuestro país.

El propósito de este trabajo es utilizar pruebas fenotípicas nuevas, reportadas a nivel internacional recientemente, para realizar la identificación de *Candida dubliniensis* a partir de muestras de candidosis de pacientes del Hospital General de México; asimismo, de lograr la identificación de esta especie, montar la metodología más adecuada para realizar una correcta y pronta identificación de este agente etiológico.

IV. ANTECEDENTES

4.1 *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis es una levadura oportunista que esta relacionada filogenéticamente de una manera muy cercana con *Candida albicans*.^(6-9, 11, 25, 26), y ha sido aislada principalmente de la cavidad oral de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de pacientes con SIDA. Este microorganismo se ha aislado en una gran variedad de regiones geográficas y sus características fenotípicas y genotípicas han sido descritas en varios reportes recientes.^(6- 9, 11, 25- 28, 30, 35, 46-50, 53-55, 59, 60, 71, 75, 76, 84, 85)

El hecho de que la distancia filogenética entre estos organismos sea tan cercana ha suscitado una discusión a nivel mundial acerca de si *Candida dubliniensis* es una nueva especie de levadura oportunista o si se trata de una variedad menos virulenta de *Candida albicans*. La controversia surge por el hecho de que *Candida dubliniensis* es una levadura que genera filamentación (tubo germinativo) y que produce pseudofilamentos con clamidoconidias, pruebas que son utilizadas de manera rutinaria para la identificación presuntiva y definitiva de *Candida albicans*.

Candida albicans es conocida por ser la especie más virulenta del género *Candida* y por ser la especie más frecuentemente implicada en los casos de candidosis en general y en particular en casos orales en individuos inmunosuprimidos e inmunocompetentes. La incidencia de infecciones causadas por *Candida albicans* en la última década, ha disminuido en comparación a la cantidad de infecciones causadas por otras especies del mismo género incluyendo *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. La aparición reciente de *Candida dubliniensis* como levadura oportunista coincide entonces con este aparente cambio epidemiológico.

Esta levadura emergente debe ser investigada a profundidad, no solo para develar con total seguridad si se trata de una nueva especie, sino porque su distribución geográfica y su aparente implicación en candidosis orales cada vez parece ser más amplia; además, por un lado, la mayoría de los aislamientos clínicos obtenidos son resistentes al fluconazol, debido a que este fármaco es el más empleado actualmente y por otro lado, los aislamientos clínicos que son susceptibles, desarrollan rápidamente resistencia a esta droga *in vitro*.

4.2 HISTORIA

La primera evidencia de *Candida dubliniensis* apareció mucho antes de la pandemia de VIH/SIDA. El aislamiento se realizó en el año de 1957 en el Reino Unido, a partir de una muestra de pulmón recuperada *post-mortem*. Esta levadura fue erróneamente identificada como *Candida stellatoidea* y se incluyó como una variedad de referencia de esta especie en la British National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF variedad 3108) ^(6, 7). Fue hasta finales de 1980 y principios de 1990 cuando se identificaron los siguientes especímenes de *Candida dubliniensis*, los que se obtuvieron de muestras orales de individuos infectados con VIH y pacientes con SIDA en Australia, Irlanda y el Reino Unido ^(6,11); sin embargo, fue hasta 1995 en Dublín, Irlanda, cuando se sugirió que estos aislamientos pertenecían a una nueva especie.⁽¹¹⁾ A partir de entonces, hay reportes de aislamiento de esta levadura en pacientes de Argentina, Australia, Alemania, Bélgica, Canadá, España, Estados Unidos, Finlandia, Francia, Grecia, Irlanda, Reino Unido y Suiza. ^(29, 36-45, 75)

Al iniciarse en los años 80 la pandemia de SIDA, se observó un aumento en los casos de candidosis, sobretudo la variedad mucocutánea, en los pacientes infectados por VIH, los cuáles recibieron tratamientos prolongados con fluconazol. A principios de los años 90, se comenzaron a reportar casos donde cepas de *Candida albicans*, que provenían de candidosis en pacientes con VIH/SIDA, mostraban ser resistentes al antimicótico fluconazol. ^(80, 82, 83)

Al principio solo se observó esta resistencia en las cepas provenientes de pacientes con VIH/SIDA y se consideraba que era adquirida al antimicótico debido al largo tiempo de exposición de la levadura al medicamento, sin embargo, con los trabajos de Sullivan y cols. ^(6, 7, 8, 11), se ha sugerido que se trata de una nueva especie de levadura y no nada más de un mecanismo de resistencia de *Candida albicans*.

En la actualidad se han generado reportes en donde se ha encontrado *Candida dubliniensis* en todo tipo de poblaciones humanas (diversos grupos étnicos, diferentes grupos de edades) y no solo en procesos patológicos sino también como flora habitual. ^(13, 14, 37-39, 41, 43, 71, 82)

4.3 LA EMERGENCIA DE *Candida dubliniensis*

Como se mencionó anteriormente, desde el primer reporte en 1995, que describió las características de *Candida dubliniensis* ^(6, 7, 11, 29, 40, 41, 44, 45, 75) hasta la fecha, se han descrito aislamientos de candidosis orales de este microorganismo en prácticamente todo el mundo ^(29, 31, 34, 36-38, 42, 43) tanto en individuos sanos como en pacientes infectados con VIH/SIDA. ^(13, 29, 31, 34, 36-41, 43-45) Esto sólo puede sugerir que la cavidad oral es la topografía más adecuada o "el lugar ideal" para *Candida dubliniensis*, lo cual no quiere decir que no se pueda aislar en otros sitios anatómicos o hasta en otras especies animales. La existencia de casos de individuos sanos con *Candida dubliniensis*, aun cuando son muy raros en este momento, sugiere que generalmente el sistema inmunológico y la flora microbiana habitual, evitan el excesivo crecimiento de este microorganismo.

La cavidad oral es un medio ambiente sumamente complejo y muy rico en flora microbiana, la cual incluye una variedad de especies de *Candida* y muy probablemente a *Candida dubliniensis*. Las poblaciones de especies de *Candida* deben cambiar con mucha frecuencia, dependiendo completamente de las

condiciones del microambiente, el cual debe ser afectado por la dieta, los tratamientos con fármacos y el estado de inmunocompetencia de un individuo.

Cuando se presenta un paciente con candidosis oral, es muy probable que más de una especie o variedad del género *Candida* se encuentre presente, lo que hace muy difícil determinar que especies están contribuyendo activamente en la generación de los síntomas de la enfermedad. Esto es fácil observarlo en pacientes con candidosis recurrentes, es aquí en particular donde *Candida albicans* puede ser reemplazada por otras especies menos virulentas como *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* o *Candida krusei*. Esta situación puede explicarse de manera hipotética si suponemos que estas especies menos virulentas pueden subsistir y persistir en la cavidad oral después del tratamiento con fármacos antifúngicos, lo cual no puede hacer *Candida albicans* y lo que ayudaría a explicar además el aparente cambio epidemiológico que esta ocurriendo en los casos de candidosis orales. Esto es cierto en los casos de *Candida glabrata* y *Candida krusei*, comparados con *Candida albicans*, son generalmente menos susceptibles al fluconazol, el antimicótico más usado comúnmente en el tratamiento de las candidosis orales. En el caso específico de *Candida dubliniensis*, los aislamientos recuperados de individuos sanos son, en su gran mayoría, susceptibles a los antifúngicos mas comunes, incluyendo al fluconazol, sin embargo, los casos de aislados de *Candida dubliniensis* con muy poca susceptibilidad, provienen de casos de pacientes con SIDA y que han tenido tratamientos previos y prolongados con este medicamento. Si esta capacidad de *Candida dubliniensis* para desarrollar resistencia, sucede de una manera rápida *in vivo*, esto puede explicar al menos en parte, su aparición como patógeno-opportunista-emergente, por lo menos, en los casos de individuos infectados con VIH y en los casos de pacientes con SIDA que han recibido tratamiento con fluconazol.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE *Candida dubliniensis* EN ESPECÍMENES CLÍNICOS

4.4.1 CARACTERÍSTICAS DE *Candida dubliniensis*.

En agar Sabouraud se observan colonias blancas, cremosas, suaves; es capaz de crecer en medios que contiene cicloheximida (actidione). En la morfología microscópica se observan múltiples blastoconidias o levaduras gemantes. En placas de agar Corn meal (harina de maíz) +Tween 80 (28° C, 72 horas) se observan pseudohifas, e hifas con blastoconidias y vesículas (clamidoconidias), las que generalmente son múltiples. La generación de tubo germinativo es positiva después de tres horas. La hidrólisis de urea es negativa.

Características fenotípicas básicas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>		
Características	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Examen directo KOH al 10%	Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas	Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas
Tinción de Gram	(+) Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas	(+) Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas
Crecimiento en Sabouraud	Colonias blancas, suaves, limitadas, opacas, ocasionalmente con pseudomicelio	Colonias blancas, suaves, limitadas, opacas, ocasionalmente con pseudomicelio
Tubo germinativo en suero a 37° C	(+) después de 3 horas	(+) después de 3 horas
Clamidoconidias en Corn meal + Tween 80	Únicas, terminales	Múltiples y en racimos
Biggy (Nickersson)	Colonias color café	Colonias color café
Tabla 2. <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>, son conocidas de manera nemotécnica como "hermanas gemelas"		

Pruebas de asimilación

	Morfología			Auxonograma									Zimograma					Otros caracteres					
				Indispensable					Electivo														
	Micelio o pseudomicelio	Clamidoconidias	Tubos germinativos	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Red. tetrazolio	Res. Actidione	Utilización KNO ₃
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	+	+	+	+	+/-	+	--	--	V	+	--	
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	V	V	+	+	+	+	--	--	--	R	+	--
<i>C. stellatoidea</i>	+	+/-	+/-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. guillemontii</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-	R	-	-

+ = positivo; -- = negativo; +/- = casi siempre positivo; V = variable; B = blanco; R = rosado; Red. = reducción; Vi = violeta; Res = resistencia

Tabla 3: Perfil de pruebas para *C. dubliniensis*. La tabla permite observar las dificultades que existen en los laboratorios al tratar de diferenciar a *C. albicans* de *C. dubliniensis* con las pruebas de rutina.

Sin embargo, a pesar de esta relación tan cercana, estos microorganismos exhiben algunas diferencias tanto fenotípicas como genotípicas, que si bien son pequeñas y sutiles, son de utilidad para intentar su identificación en los diversos especímenes biológicos que se trabajan de manera rutinaria en los laboratorios de microbiología.

4.4.2 PRUEBAS FENOTÍPICAS

La ventaja de utilizar estas pruebas radica en que generalmente son más fáciles de realizar y más económicas que los estudios de biología molecular; la lectura de estas pruebas puede realizarse sin la necesidad de aparatos complejos y generalmente no es necesario tener mucha experiencia en la técnica para poder tener una lectura confiable. De manera muy general están basadas en el hecho de que si dos microorganismos pertenecen a especies diferentes, van a exhibir características únicas de especie que pueden observarse fácilmente (morfología colonial diversa, perfiles enzimáticos diferentes, etc.). A continuación se presentan algunas de las pruebas fenotípicas descritas a nivel internacional para la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

Crecimiento en caldo de Sabouraud hipertónico. ⁽⁴⁶⁾

Esta prueba se realiza en medio líquido, los resultados de ésta dan las siguientes lecturas: positiva para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis*. Lo anterior se traduce como crecimiento o no. Esta prueba está basada en la capacidad de *C. albicans* para crecer en un medio hipertónico y en la aparente incapacidad de *C. dubliniensis* para hacerlo. Confiabilidad: sensibilidad: 100%; especificidad: 100%.

Crecimiento en Staib agar. ^(47, 55, 59)

Esta prueba se realiza en placas de agar que contienen como ingrediente principal el extracto de la semilla *Guizotia abyssinica* (alpiste negro). Este medio se ha reportado para dos características en particular, la formación de clamidoconidias, pseudomicelio e hifas por un lado y crecimiento únicamente de blastoconidias por otro. Los resultados de la prueba pueden observarse de la siguiente manera: positiva para *Candida dubliniensis* y negativa para *Candida albicans*. Lo anterior se traduce como crecimiento con clamidoconidias, pseudohifas e hifas para *C. dubliniensis* y crecimiento de blastoconidias para *C. albicans*, características que son de muy fácil observación.

Confiabilidad morfología colonial: sensibilidad: 100% especificidad: 97%.

Confiabilidad clamidoconidias: sensibilidad: 100%; especificidad: 93%.

Crecimiento a 42° C ó 45° C. ⁽⁵⁰⁾

Esta prueba puede llevarse a cabo tanto en medio líquido como en placas de agar. Los resultados de esta prueba pueden variar ligeramente dependiendo de la temperatura que se utilice. Para 42° C: es positiva para *Candida albicans* y negativa para *Candida dubliniensis*, lo que se traduce como buen crecimiento de la primera y muy pobre o nulo para la segunda. Para 45° C: es positiva para *C. albicans* es decir da un buen crecimiento y negativa para *C. dubliniensis*, sin crecimiento.

Confiabilidad a 42 ° C: sensibilidad: 100%; especificidad: 90%.

Confiabilidad a 45 ° C: sensibilidad: 100%; especificidad: 100%.

Inducción de tubo germinativo a 39° C. ^(51, 52)

Esta prueba se lleva a cabo en medio líquido y la lectura se realiza a los 60 minutos generando la siguiente lectura: positiva para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis*, esto se traduce como formación de tubo germinativo para *Candida albicans* a los 60 minutos y no formación de tubo germinativo para *Candida dubliniensis* a los 60 minutos.

Confiabilidad: sensibilidad: 100%; especificidad: 100%.

Crecimiento en agar de Pal. ⁽⁵³⁾

Esta prueba se realiza en placas de agar que tienen como ingrediente básico el extracto de la semilla *Helianthus annuus* (girasol), esta es una prueba similar a la prueba de Staib agar; ya que ambas semillas pertenecen a la misma familia botánica, por lo que la lectura es exactamente la misma, es decir: positiva para *Candida dubliniensis* y negativa para *Candida albicans*, con crecimiento y formación de pseudohifas e hifas para la primera y sólo crecimiento para la segunda.

Confiabilidad morfología colonial: sensibilidad: 100%; especificidad: 100%.

Confiabilidad clamidoconidias: sensibilidad: 100%; especificidad: 94%.

Crecimiento en CHROMagar Candida. ^(56, 79)

Esta prueba se lleva a cabo en placas de agar que contiene compuestos cromógenos que al ser asimilados por las levaduras generan una coloración específica para cada especie. De modo que la lectura es la siguiente: coloración verde clara para *Candida albicans* y coloración verde oscura para *Candida dubliniensis*.

Confiabilidad: sensibilidad: 100%; especificidad: 100%

Crecimiento en medio albicans ID. ⁽⁵⁷⁾

Esta prueba es similar a la prueba en CHROMagar *Candida*, con la diferencia de que tiene menos utilidad, ya que este medio es específico para la búsqueda de *C. albicans* y el resto de especies de *Candida spp*, se observan de color blanco. En este medio *Candida albicans* se observa de color azul turquesa brillante y las colonias de *Candida dubliniensis* se ven de color azul turquesa oscuro.

Confiabilidad: sensibilidad: 100%; especificidad: 90%

Crecimiento en Sabouraud-Azul de Metileno agar. ⁽⁵⁸⁾

Esta prueba se realiza en placas de agar Sabouraud a las cuales se les agrega Azul de metileno. La adición de este colorante permite identificar un halo de fluorescencia amarilla cuando las placas son observadas bajo lámparas de luz de 365 nm (Luz de Wood) en cuarto oscuro. La lectura se realiza de la siguiente manera: las placas son observadas bajo la lámpara de Luz de Wood en un cuarto oscuro y se observa la presencia o ausencia de fluorescencia amarilla, siendo una prueba positiva para *Candida albicans* y negativa para *Candida dubliniensis*.

Confiabilidad: sensibilidad: 83%; especificidad 85%.

Crecimiento en Corn meal agar + Tween 80. ^(1, 2, 3)

Esta prueba se lleva a cabo en placas de agar de harina de maíz y junto con el medio de Rice meal (harina de arroz) son los más utilizados en los laboratorios de microbiología médica para la identificación de *Candida albicans* por la generación de clamidoconidias, lo que genera la siguiente lectura: *Candida albicans* genera pocas clamidoconidias generalmente únicas y terminales en los extremos de las pseudohifas; en cambio, *Candida dubliniensis* genera abundantes clamidoconidias en pseudohifas alargadas y cortas que se observan en grupos de por lo menos 2 o 3 y que generalmente se encuentran en los extremo de las pseudohifas

Confiabilidad: sensibilidad: 100%; especificidad: 90%

Crecimiento en Caseína agar. ⁽⁶⁰⁾

Este medio se prepara en placas de agar que contienen leche descremada como ingrediente básico. Se utiliza en esta ocasión para observar la formación de clamidoconidias, es una prueba similar a las ya mencionadas de agar Corn meal y rice meal, además la lectura es la misma, sin embargo tiene la ventaja de que es un medio de cultivo de fácil preparación y mucho más económico.

Confiabilidad: sensibilidad: 95%; especificidad: 90%

Pruebas de asimilación bioquímica API 20 C AUX y API 32 C AUX ^(48, 49)

Estas pruebas nos dan un resultado en base a los perfiles bioquímicos que presenta cada especie. La lectura se lleva a cabo al observar un panel de celdillas, las cuales contienen diferentes carbohidratos en medio líquido, y cuya lectura es positiva, si al término del tiempo de incubación se observa turbidez en esa celdilla (señal de que el carbohidrato fue asimilado y hubo crecimiento del microorganismo), al contar las celdillas con turbidez, y siguiendo las reglas de lectura del fabricante es posible generar un código numérico específico para ese microorganismo, este código se introduce en la computadora, la cual busca en una base de datos el tipo de microorganismo del que se trata exactamente, sino encuentra coincidencias, genera una lista de los microorganismos con un margen de probabilidad en orden descendente. Estas pruebas se basan principalmente en la utilización de dos sustratos: uno es la xilosa (XYL) y otro es el α -metil-D-glucósido (MDG). En el caso de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* pueden ocurrir confusiones.

Confiabilidad XYL: Sensibilidad: 100%; especificidad: 96%

Confiabilidad MDG: sensibilidad: 100%; especificidad: 54%.

Pruebas para la diferenciación fenotípica entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

Prueba	Apariencia		Confiabilidad	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	Sensibilidad	Especificidad
Pruebas térmicas				
Tubo germinativo a 39° C	Generación de tubo germinal a los 60 minutos de incubación	No hay generación de tubo germinal, mantiene su forma de levadura al realizar la lectura a los 60 minutos de incubación	100%	100%
Crecimiento a 42° C	Se observa buen crecimiento a las 48 horas de incubación	Se observa crecimiento muy pobre y/o prácticamente nulo a las 48 horas de incubación	100%	90%
Crecimiento a 45° C	Se observá buen crecimiento a las 48 horas de incubación	Crecimiento nulo a las 48 horas de incubación	100%	100%

Pruebas para la diferenciación fenotípica entre <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>				
	Apariencia		Confiabilidad	
Prueba	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	Confiabilidad	Sensibilidad
Pruebas cromogénicas				
Agar Sabouraud + Azul de metileno	Fluorescencia amarilla bajo la luz de 365 nm (Luz de Wood) a las 24 horas de incubación	No hay fluorescencia amarilla bajo la luz de 365 nm a las 24 horas de incubación	83%	85%
Candiselect ID	Se observan colonias de color azul-turquesa claro a las 48 horas de incubación	Se observan colonias azul-turquesa oscuro a las 48 horas de incubación	100%	90%
CHROMagar Candida	Se observan colonias verde claro a las 48 horas de incubación	Se observan colonias verde oscuro a las 48 horas de incubación	100%	100%

Pruebas para la diferenciación fenotípica entre <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>				
	Apariencia		Confiabilidad	
Prueba	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	Confiabilidad	Especificidad
Pruebas para la generación de clamidoconidias y diferenciación morfológica				
Agar Corn meal + Tween 80	Colonias suaves con clamidoconidias únicas y terminales	Colonias suaves con clamidoconidias abundantes y en grupos y terminales	100%	90%
Agar Caseína	Colonias suaves con clamidoconidias únicas y terminales	Colonias suaves con clamidoconidias abundantes y en grupos y terminales	95%	90%
Agar Staib	Colonias suaves sin formación de pseudomicelio	Colonias rugosas con formación de pseudomicelio y clamidoconidias	Morfología colonial: 100%	Morfología colonial: 97%
			Clamidoconidias: 100%	Clamidoconidias: 93%
Agar Pal	Colonias suaves sin formación de pseudomicelio	Colonias rugosas con formación de pseudomicelio y clamidoconidias	Morfología colonial: 100%	Morfología colonial: 100%
			Clamidoconidias: 100%	Clamidoconidias: 94%

Pruebas para la diferenciación fenotípica entre <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>				
Prueba	Apariencia		Confiabilidad	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	Confiabilidad	Especificidad
Pruebas bioquímicas (API 20 C AUX)				
Asimilación de xilosa (XYL)	Asimilación. No siempre hay buena diferenciación de la especie.	No hay asimilación. El perfil es inconsistente.	100%	96%
Asimilación de α -metil-D-glucósido	Asimilación. No siempre hay buena diferenciación de la especie.	No hay asimilación. El perfil es inconsistente	100%	54%
Otras pruebas				
Caldo Sabouraud hipertónico (6.5%)	Se observa buen crecimiento después de 48 horas de incubación	Crecimiento nulo después de 48 horas de incubación	100%	100%

4.4.3 PRUEBAS GENOTÍPICAS

Los primeros aislados de *Candida dubliniensis* fueron encontrados por los patrones inusuales de huella digital de ADN (DNA fingerprint patterns) que se presentaban al utilizar la sonda 27A específica para la huella digital de ADN de *Candida albicans* (*C. albicans*-specific DNA fingerprinting probe 27A). Se han utilizado una gran variedad de técnicas para observar diferencias en la disposición de las secuencias del cromosoma en cada especie, estas pruebas incluyen huellas digitales con oligonucleótidos homólogos a las secuencias microsatelitales (fingerprinting with oligonucleotides homologous to microsatellite sequences), electroforesis en gel de campos pulsados (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) y análisis de PCR con amplificación polimórfica de ADN al azar (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD, PCR analysis). Estos datos indican que la organización genómica de *Candida dubliniensis* es fácilmente distinguible de la de *Candida albicans*. Recientemente, han sido identificados elementos repetitivos y específicos de especie en el ADN de *Candida dubliniensis*, lo cual puede ser utilizado para una sonda de huella digital de ADN, esto ayudaría enormemente en estudios epidemiológicos

El hecho de que *Candida dubliniensis* tuviera una organización genómica diferente fue insuficiente para delimitar a este microorganismo como una especie nueva y diferente de *Candida albicans*. Para determinar la relación filogenética de estos organismos fue necesario demostrar además, la existencia de una divergencia (dispersión) significativa en las secuencias de nucleótidos de estas dos especies. La evidencia final y más contundente de que *Candida dubliniensis* es una especie nueva llegó del análisis comparativo de las secuencias de los genes del ARN ribosomal (rARN) de varias especies de *Candida*. En la investigación original se describe que se encontró una región de 600 pares de bases (bp), que incluye a la región variable V3 de los genes del ARNr largo (lrARN), que difiere tan sólo en un 2.3 % entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Un análisis similar de la región D1/D2 de los genes lrARN reveló un

grado de divergencia en nucleótidos significativo entre ambas especies. Aunado a estos resultados, cuando se comparó la secuencia del auto-splicing de los intrones del grupo I presentes en los genes del IrARN de las dos especies, se observó que el intrón de *Candida dubliniensis* es casi idéntico al de *Candida albicans*, sólo difieren un poco en dos regiones stem-loop.

La posición filogenético de *Candida dubliniensis* se ha establecido al comparar las secuencias completas de los genes del ARN ribosomal pequeño (srRNA), de aproximadamente 1.8 kb, de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, lo que reveló una diferencia de apenas 1.4 %. Además de estas secuencias de srRNA, se ha utilizado en estudios filogenéticos el gen ACT1, el cual codifica para la proteína estructural actina. Cuando se comparan los genes de ACT1 de estos microorganismos, se observa una diferencia de 2.1 % en las secuencias codificantes, mientras que los intrones menos altamente conservados son diferentes en un 16.6 %.

Otra técnica basada en las diferencias de las secuencias génicas y con potencial para su uso en identificaciones rápidas de *Candida dubliniensis* es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En la actualidad se han diseñado iniciadores (primers) en base a la secuencia de la región D1/D2 del gen IrARN y del intrón de ACT1. Usando esta prueba se ha logrado identificar a *Candida dubliniensis* de manera exacta en menos de 4 horas. También se han diseñado iniciadores específicos para *Candida albicans* basados en las secuencias de P11R1, el cual no amplifica cuando se utiliza un templado de ADN de *Candida dubliniensis*. El análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción largos obtenidos al usar iniciadores para PCR que delimitan varias regiones en el locus del rRNA ha demostrado que permite una discriminación entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. También se ha desarrollado un ensayo inmunoenzimático de PCR, el que utiliza una sonda de ADN específica para *Candida dubliniensis* derivada de la región ITS2 del locus del rARN. Estas técnicas son altamente específicas, rápidas, fáciles de llevar a cabo y aplicables a un gran número de

aislados y pueden permitir una identificación rápida y exacta de *Candida dubliniensis* en el futuro.

4.4.4 RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS

Este tipo de prueba se lleva a cabo en medios líquidos, y en la actualidad existen varios métodos, siendo los más utilizados el método de dilución en caldo de Pfaller y el método de microdilución en caldo de la NCCLS. Los antimicóticos más utilizados en esta prueba son itraconazol, ketoconazol, fluconazol y anfotericina B.

Itraconazol

Es un compuesto triazólico de segunda generación sintetizado en 1980. Es un fármaco fungicida por su acción sobre el citocromo P450 y actúa a nivel del peróxido de hidrógeno. ⁽¹⁾ Los criterios de susceptibilidad del NCCLS en concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) para este fármaco son las siguientes:
(35)

Parámetro	Susceptible	Susceptible dependiente de dosis	Resistente
Dosis	Menor o igual a 0.125 µg/mL	De 0.25 a 0.5 µg/mL	Igual o mayor a 1 µg/mL

Ketoconazol

Es un compuesto imidazólico sintetizado en 1977. su principal sitio de acción es la membrana celular; inhibe la biosíntesis del ergosterol e interfiere con otros lípidos de la membrana, esto da lugar a una membrana con bajo contenido de ergosterol, lo que conduce a una mayor permeabilidad y a un deterioro progresivo. Esto significa que puede ser un fármaco fungistático a bajas concentraciones o fungicida a concentraciones altas. ⁽¹⁾

Parámetro	Susceptible	Susceptible dependiente de dosis	Resistente
Dosis	Menor o igual a 0.125 µg/mL	De 0.25 a 0.5 µg/mL	Igual o mayor a 1 µg/mL

Fluconazol

Es un derivado triazólico hidrosoluble. Es un fármaco fungicida contra levaduras, ya que inhibe la síntesis de esteroides en la membrana de los hongos y los derivados son tóxicos para la célula fúngica. ⁽¹⁾

Los criterios de susceptibilidad del NCCLS en concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) para este fármaco son las siguientes: ⁽³⁵⁾

Parámetro	Susceptible	Susceptible dependiente de dosis	Resistente
Dosis	Menor o igual a 4 µg/mL	De 8 a 32 µg/mL	Igual o mayor a 64 µg/mL

Los reportes a nivel internacional indican que *Candida dubliniensis* muestra resistencia al fluconazol en tratamientos de duración larga, como ocurre generalmente en los casos de candidosis oral en individuos con infección por VIH.

Anfotericina B

Se aisló en 1955 de *Streptomyces nodosus*. Se une con rapidez al ergosterol, ocasiona alteraciones estructurales reversibles a bajas concentraciones y alteraciones irreversibles a altas concentraciones. ⁽¹⁾ Su principal problema es la nefrotoxicidad y la hepatotoxicidad, por lo que los pacientes deben ser vigilados constantemente durante su administración.

De manera general, se ha reportado que la gran mayoría de los aislados de *Candida dubliniensis* son susceptibles al fluconazol. Sin embargo, se ha observado un fenómeno interesante en relación a este microorganismo, el cual consiste en que esta especie es capaz de generar resistencia *in vitro*, simplemente con hacer crecer la cepa en medios que contienen fluconazol e ir incrementando progresivamente la concentración para generar la resistencia al fármaco en cuestión. A la fecha no se ha observado este fenómeno en *Candida dubliniensis* al utilizar itraconazol, ketoconazol o anfotericina B.

Es necesario llevar a cabo más estudios que nos ayuden a revelar todos los factores de virulencia de *Candida dubliniensis*, es probable que existan pocos estudios de este tipo debido a que se puede pensar que por la cercana relación que hay con *Candida albicans* estos mecanismos deben ser iguales o muy parecidos, pero si pretendemos comprender completamente a este microorganismo, no debemos pasar por alto ninguna prueba ni estudio.

Para lograr entender completamente la importancia clínica de *Candida dubliniensis*, es de suma importante llevar a cabo estudios epidemiológicos. En estos estudios debemos ser capaces de identificar a esta especie en muestras clínicas de manera exacta y rápida, por lo que las técnicas empleadas deben ser capaces de soportar un gran volumen de muestras, deben ser económicas, fáciles de aplicar y reproducibles.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CEPAS DE REFERENCIA:

Cepa	Código de identificación asignado
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028*	UME ATCC 90028
<i>Candida albicans</i> **	UADY 1
<i>Candida albicans</i> ***	CFQ 1
<i>Candida dubliniensis</i> **	IP 1
<i>Candida dubliniensis</i> **	IP 2
<i>Candida dubliniensis</i> ****	UADY 2
<i>Candida dubliniensis</i> ****	UADY 3
<i>Candida glabrata</i> ***	CFQ 2
<i>Candida tropicalis</i> ***	CFQ 3
<i>Candida krusei</i> ***	CFQ 4
<i>Candida parapsilosis</i> ***	CFQ 5

Lugar de procedencia de la cepa: * Unidad de Medicina Experimental (UME) UNAM, Hospital General de México, ** Departamento de Investigación en Microbiología Oral, Facultad de Odontología, UADY, *** Cepario de Facultad de Química, UNAM; **** Instituto Pasteur, Paris, Francia.

5.1.1 PRESERVACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA

- 1.- Se sembraron las cepas de referencia, en área estéril por mechero a flama alta, en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca conteniendo 3mL de caldo de Sabouraud y se incubaron a 28 ° C durante 48 horas.
- 2.- Se resembraron las cepas de referencia, en área estéril generada por mechero a flama alta, en tubos de 13 x 100 conteniendo agar Sabouraud en pico de flauta y se incubaron a 28 ° C durante 48 horas.
- 3.- Se almacenaron las cepas a temperatura ambiente hasta el momento de las pruebas, las cuales se realizaron no más allá de 96 horas después del almacenamiento.

4.- Después de correr una prueba se repitieron los pasos 1 a 3 durante todo el ciclo de pruebas.

Con esta serie de pasos pretendimos mantener inalterada la actividad bioquímica de las cepas, tratando de evitar con ello los posibles falsos positivos o falsos negativos en los resultados de las pruebas.

5.2 CEPAS DE TRABAJO

Se utilizaron 313 cepas de *Candida sp* colectadas en el Laboratorio de Micología, ubicado en el Servicio de Dermatología del Hospital General de México, en el período correspondiente a los años 2001–2004, las cuales fueron identificadas de manera presuntiva como *Candida albicans* en base a la observación del examen directo (cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas), y/o de las características generales de la cepa de *Candida albicans* en los medios de agar Sabouraud y Agar Sabouraud con antibióticos (Micobiotic agar).

5.2.1 OBTENCIÓN DE CEPAS Y ALMACENAMIENTO

- 1.- Se obtuvieron muestras provenientes de diversas topografías anatómicas de los pacientes
- 2.- Se confirmó de manera presuntiva inmediata la existencia de candidosis por *Candida albicans* al observar pseudohifas y/o cúmulos de blastoconidias en los exámenes directos con KOH al 10% revisados en el microscopio.
- 3.- Se sembraron las muestras clínicas de los pacientes, en área estéril generada por mechero a flama alta, en tubos de 16 x 150 con agar Sabouraud y agar Micosel en forma de pico de flauta y se incubaron a 28 ° C por 48 horas.
- 4.- Se confirmó de manera presuntiva posterior la presencia de *Candida albicans* al obtener crecimiento típico de levadura tanto en agar Sabouraud como en agar Sabouraud con antibióticos.

5.- Se almacenaron las cepas, en área estéril generada por mechero a flama alta, en tubos de 13 x 100 con tapa de rosca conteniendo 3mL de agua destilada estéril a temperatura ambiente ^(5, 89).

6.- Todas las cepas obtenidas se almacenaron de esta manera hasta el momento de su reactivación, antes de correr las pruebas fenotípicas de interés.

5.2.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO

1.- Se resuspendieron de manera suave los botones formados por las cepas en el fondo de los tubos de almacenamiento.

2.- Los resuspendidos de las cepas se sembraron, en área estéril generada por mechero a flama alta, en tubos de agar de 16 x 150 conteniendo agar Sabouraud en pico de flauta y se incubaron a 28 ° C durante 48 horas para recuperación de las cepas.

3.- Si la cepa se encontraba contaminada por bacterias u hongos se sembraba, en área estéril generada por mechero a flama alta, un tubo de 16 x 150 con agar Sabouraud con antibióticos en pico de flauta y se colocaba en incubación a 28 ° C durante 48 horas.

4.- Después de la recuperación de la cepa se tomó, en área estéril generada por mechero a flama alta, una asada de cualquiera de los tubos de pico de flauta (de preferencia del tubo de Sabouraud con antibióticos) y se inoculó en tubos de 13 x 100 conteniendo 3 mL de caldo de Sabouraud y se colocó en incubación a 28 ° C durante 48 horas para lograr la reactivación de las cepas.

5.- Después de la primera prueba, se conservaron las cepas de los tubos de 13 x 100 con caldo de Sabouraud a temperatura ambiente, y por no más de 15 días.

6.- En el momento de correr una prueba nueva, se tomaba una asada de resuspendido de los tubos del paso 5, siempre y cuando no tuvieran más de 15 días en almacenamiento, de lo contrario, se repetían los pasos 2, 3 y 4 para garantizar la completa actividad bioquímica de las cepas.

7.- El procedimiento de obtención y reactivación se llevó a cabo para las 313 cepas en estudio y para las 11 cepas de referencia.

5.3 METODOLOGÍA

A continuación se describen las técnicas utilizadas en este trabajo para la identificación de *Candida dubliniensis*.

5.3.1 PRUEBAS TÉRMICAS.

a) Crecimiento a 42 ° C

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en agar Sabouraud a 42° C por 48 horas. La lectura de esta prueba se verificó como: *Candida albicans*, si el crecimiento fue bueno y *Candida dubliniensis*, si el crecimiento fue pobre o nulo.

b) Crecimiento a 45 ° C

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en agar Sabouraud a 45° C por 48 horas. La lectura de esta prueba se verificó como: *Candida albicans*, si el crecimiento fue bueno y *Candida dubliniensis*, si el crecimiento fue nulo.

5.3.2 PRUEBAS MORFOLÓGICAS

a) *Cerelac + Tween 80*

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en agar Cerelac adicionado con 1% de Tween 80 para investigar la formación de clamidoconidias. La lectura de la prueba se realizó a las 48 horas y se observó en microscopio óptico en 40X en donde se verificó la morfología que presentaban las cepas y se calificaron de la siguiente manera: *Candida albicans*, si la cepa presentó clamidoconidias únicas y terminales; *Candida dubliniensis*, si la cepa presentó abundantes clamidoconidias en grupos o en pares contiguos y *Candida sp*, si la cepa presentó otras características, por ejemplo, formación solo de pseudohifas o presencia únicamente de clamidoconidias

b) *Alpiste Negro agar*

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en agar Alpiste negro a 28° C por 48 horas para investigar la morfología de las cepas. Los resultados se observaron de la siguiente manera: *Candida albicans*, si la cepa se observó suave, sin generación de pseudomicelio y clamidoconidias y conservando su forma de levadura; y *Candida dubliniensis*, si la cepa se observó suave o rugosa pero tuvo generación de pseudomicelio y/o clamidoconidias. La generación de pseudomicelio se verificó a simple vista, con lupa y en microscopio óptico a 10X y 40X.

5.3.3 PRUEBAS CROMOGÉNICAS

a) *Candiselect* agar

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en agar cromogénico *Candiselect* ID por 48 horas a 28° C para investigar la generación de colonias coloridas en este medio. El resultado de esta prueba se observó de la siguiente manera: *Candida albicans*, si las colonias obtenidas presentaron un color azul turquesa claro; *Candida dubliniensis*, si las cepas presentaron una tonalidad azul turquesa oscuro y *Candida sp*, si las cepas se observaron de color blanco.

b) *DIBICROM* agar *Candida*

Cada una de las cepas de referencia y de las cepas de trabajo fueron cultivadas en caldo Sabouraud a 28° C por 48 horas, después de este periodo, todas las cepas fueron subcultivadas en *DIBICROM* agar *Candida* utilizando palillos de madera estériles para maximizar el área de cultivo y se incubaron a 28° C por 48 horas. La lectura de esta prueba generó el siguiente resultado: *Candida albicans*, si la cepa presentó una coloración verde oscuro; *Candida dubliniensis*, si la cepa presentó una coloración verde claro, *Candida sp*, si la cepa presentó una coloración rosa y *Candida tropicalis*, si la cepa presentó una coloración gris azulado.

VI RESULTADOS

En total se trabajaron 313 muestras, las cuales se obtuvieron de 24 sitios o muestras anatómicas diferentes, en la tabla siguiente se observan los porcentajes de incidencia de cada tipo de muestra por año y en total.

Relación de muestras por Topografía Clínica, por año y total.					
Topografía Clínica	2001	2002	203	204	Total
Vulva	3	1	13	20	37
Orina	5	2	23	15	45
Pene	1	0	1	2	4
Expectoración	3	5	18	18	44
Oral	3	13	37	46	99
Espujo	7	7	4	4	22
Lagrimal	1	0	0	0	1
Exudado Faríngeo	1	0	0	2	3
Lavado bronquial	3	1	4	7	15
Líquido Pleural	1	0	0	0	1
Sangre	0	1	4	1	6
Líquido de ascitis	0	1	0	0	1
Conducto auditivo	0	1	1	1	3
Espalda	0	1	0	1	2
Onicomycosis	0	1	0	3	4
líquido peritoneal	0	0	7	0	7
Ex. Palatina	0	0	1	0	1
Lavado Bronco-alveolar	0	0	5	3	8
Mucosa nasal	0	0	2	0	2
Líquido de Fibrobroncoscopía	0	0	0	1	1
Secreción bronquial	0	0	1	1	2
Líquido biliar	0	0	0	1	1
Ingle	0	0	0	2	2
Pliegue Submamario	0	0	0	2	2
Total	28	34	121	130	313

Relación de muestras por Topografía Clínica, por año y total.					
Topografía Clínica	2001	2002	203	204	Total
Vulva	0,96%	0,32%	4,20%	6,40%	11,88%
Orina	1,60%	0,64%	7,30%	4,80%	14,4%
Pene	0,32%	0	0,32	0,64%	1,30%
Expectoración	0,96%	1,60%	5,80%	5,80%	14,20%
Oral	0,96%	4,20%	11,80%	14,70%	31,7%
Espujo	2,20%	2,20%	1,30%	1,30%	7,00%
Lagrimal	0,32%	0	0	0	0,32%
Exudado Faringeo	0,32%	0	0	0,64%	0,96%
Lavado bronquial	0,96%	0,32%	1,30%	2,20%	4,80%
Líquido Pleural	0,32%	0	0	0	0,32%
Sangre	0	0,32%	1,30%	0,32%	0,64%
Líquido de ascitis	0	0,32%	0	0	0,32%
Conducto auditivo	0	0,32%	0,32%	0,32%	0,96%
Espalda	0	0,32%	0	0,32%	0,64%
Onicomosis	0	0,32%	0	0,96%	1,30%
líquido peritoneal	0	0	2,20%	0	2,20%
Ex. Palatina	0	0	0,32%	0	0,32%
Lavado broncoalveolar	0	0	1,60%	0,96%	2,60%
Mucosa nasal	0	0	0,64%	0	0,64%
Líquido de fibrobroncoscopia	0	0	0	0,32%	0,32%
Secreción bronquial	0	0	0,32%	0,32%	0,64%
Líquido biliar	0	0	0	0,32%	0,32%
Ingle	0	0	0	0,64%	0,64%
Pliegue submamario	0	0	0	0,64%	0,64%
Total	8,92	10,88	38,7	41,5%	100%

Se muestran los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo (positivo y negativo) para cada prueba, estos valores se calcularon con los resultados de las cepas de referencia en la prueba en medio cromogénico DIBICROM ("gold estándar").

6.1 PRUEBAS TÉRMICAS

6.1.1 CRECIMIENTO A 42 ° C

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

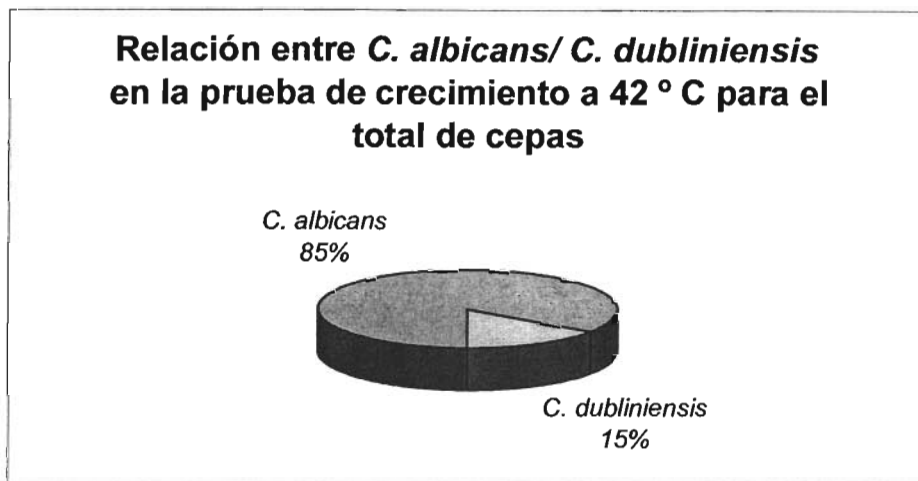
Clave de crecimiento	Identificación presuntiva
Nulo	<i>C. dubliniensis</i>
Pobre	<i>C. dubliniensis</i>
Regular	<i>C. albicans</i>
Bueno	<i>C. albicans</i>

Prueba: Crecimiento a 42° C		
Condiciones: 72 horas a 42° C		
Muestras: Cepas de referencia		
Cepa	Código de identificación	Resultado
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	UME ATCC 90028	Nulo
<i>C. albicans</i>	UADY 1	Nulo
<i>C. albicans</i>	CFQ 1	Bueno
<i>C. dubliniensis</i>	IP 1	Bueno
<i>C. dubliniensis</i>	IP 2	Nulo
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 2	Nulo
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 3	Bueno
<i>C. glabrata</i>	CFQ 2	Bueno
<i>C. tropicalis</i>	CFQ 3	Bueno
<i>C. krusei</i>	CFQ 4	Nulo
<i>C. parapsilosis</i>	CFQ 5	Nulo

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	25%
Especificidad	50%
Valor predictivo (+)	25%
Valor predictivo (-)	50%

De las 313 muestras, 48 de ellas (15.3%) se identificaron como *C. dubliniensis* en base al crecimiento muy pobre o nulo observado en esta prueba.



6.1.2 CRECIMIENTO A 45 ° C

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

Clave de crecimiento	Identificación presuntiva
<i>Nulo</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>Pobre</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Regular</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Bueno</i>	<i>C. albicans</i>

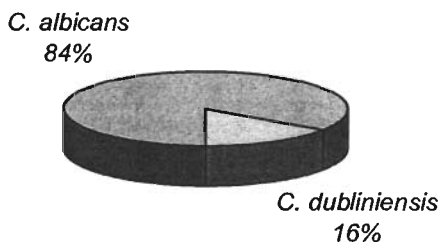
Prueba: Crecimiento a 45° C		
Condiciones: 72 horas a 45° C		
Muestras: Cepas de referencia		
Cepa	Código de identificación	Resultado
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>UME ATCC 90028</i>	Nulo
<i>C. albicans</i>	<i>UADY 1</i>	Pobre
<i>C. albicans</i>	<i>CFQ 1</i>	Bueno
<i>C. dubliniensis</i>	<i>IP 1</i>	Bueno
<i>C. dubliniensis</i>	<i>IP 2</i>	Nulo
<i>C. dubliniensis</i>	<i>UADY 2</i>	Regular
<i>C. dubliniensis</i>	<i>UADY 3</i>	Bueno
<i>C. glabrata</i>	<i>CFQ 2</i>	Bueno
<i>C. tropicalis</i>	<i>CFQ 3</i>	Bueno
<i>C. krusei</i>	<i>CFQ 4</i>	Nulo
<i>C. parapsilosis</i>	<i>CFQ 5</i>	Nulo

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	66.7%
Especificidad	25.0%
Valor predictivo (+)	40.0%
Valor predictivo (-)	50.0%

En esta prueba, del total de las 313 muestras, 49 se identificaron como *C. dubliniensis* (15.6%) en base a la observación nula de crecimiento del microorganismo en el medio.

**Relación entre *C. albicans*/*C. dubliniensis*
en la prueba de crecimiento a 45 ° C para el
total de las cepas**



6.2 PRUEBAS MORFOLÓGICAS

6.2.1 AGAR CERELAC + TWEEN 80

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

Descripción	Clave morfológica	Identificación presuntiva
blastoconidias sin pseudohifas ni clamidoconidias	<i>lev</i>	<i>C. glabrata</i>
blastoconidias y pseudohifas sin clamidoconidias	<i>Psh s/c</i>	<i>C. sp</i>
blastoconidias, pseudohifas, clamidoconidias únicas generalmente terminales	<i>c. u</i>	<i>C. albicans</i>
blastoconidias, pseudohifas, clamidoconidias múltiples generalmente terminales	<i>c. m.</i>	<i>C. dubliniensis</i>

Prueba: Clamidoconidias en agar CERELAC + Tween 80		
Condiciones: 72 horas a 28 ° C		
Muestras: Cepas de referencia		
Cepa	Código de identificación	Resultado
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	UME ATCC 90028	c. u
<i>C. albicans</i> 1525	UADY 1	c. u
<i>C. albicans</i> x	CFQ 1	c. u
<i>C. dubliniensis</i> 4	IP 1	lev
<i>C. dubliniensis</i> 30	IP 2	lev
<i>C. dubliniensis</i> 1810	UADY 2	c. m.
<i>C. dubliniensis</i> 1910	UADY 3	lev
<i>C. glabrata</i> x	CFQ 2	lev
<i>C. tropicalis</i> x	CFQ 3	psh s/c
<i>C. krusei</i> x	CFQ 4	lev
<i>C. parapsilosis</i> x	CFQ 5	psh s/c

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	57.0%
Especificidad	100%
Valor predictivo (+)	100%
Valor predictivo (-)	66.7%

Del total de las 313 muestras probadas, 123 (39.3%) se identificaron como *C. albicans*, debido a que se observaron clamidoconidios únicos y terminales; 30 (9.6%) se identificaron como *C. dubliniensis* en base a la observación microscópica (40X) de blastoconidias, pseudohifas y abundantes clamidoconidias múltiples, generalmente dispuestas en grupos o racimos (de 2 hasta 7 u 8) y generalmente terminales, aunque también fue posible observar clamidoconidias intercalares. También fue posible evaluar en este medio la posible presencia de *C. glabrata*, ya que 74 muestras (23.6%) mostraron generar únicamente blastoconidias en este medio, asimismo se evaluó la presencia de *Candida sp.*, al observar que 86 muestras (27.5%) mostraron ser capaces de generar pseudohifas

más no clamidoconidias, características de otras especies de *Candida albicans*.

Relación entre *C. albicans*/*C. dubliniensis* en la prueba de crecimiento en agar Cerelac + Tween 80 para el total de las cepas

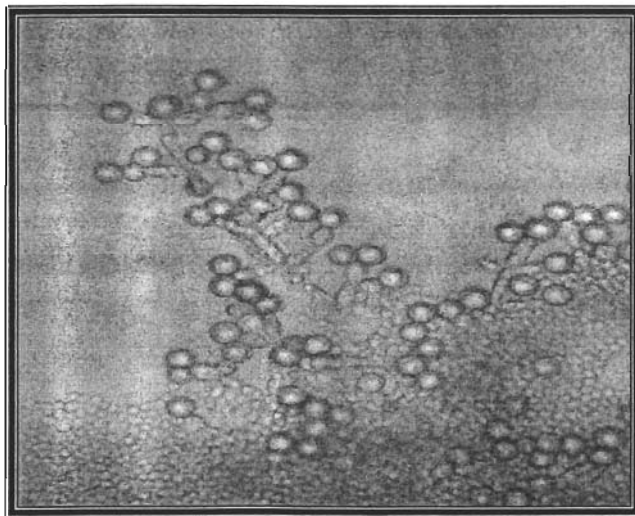
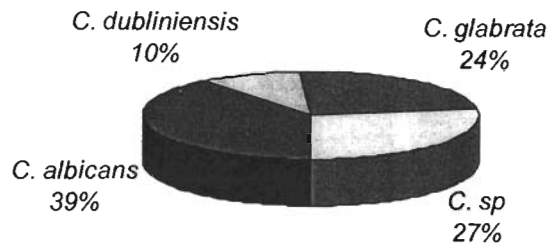


Imagen 1. *Candida dubliniensis* generando clamidoconidios múltiples en agar Cerelac + tween 80 a las 48 horas a 28° C

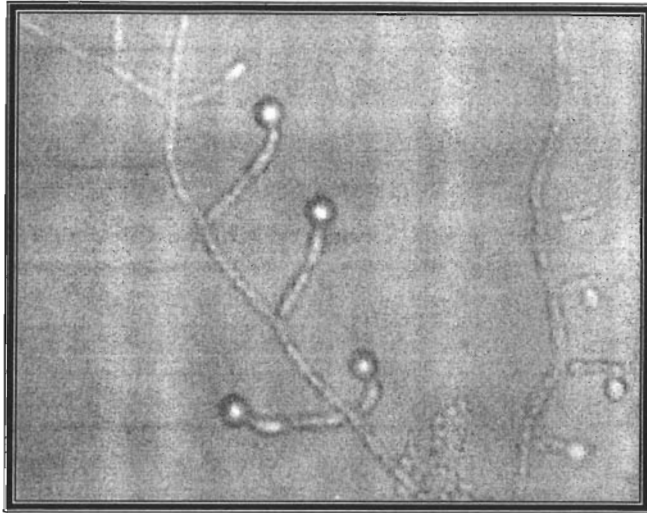


Imagen 2. *Candida albicans* generando clamidoconidios únicos en agar Cerelac + tween 80 a las 48 horas a 28° C.

6.2.2 AGAR ALPISTE NEGRO

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

Descripción	Clave morfología	Identificación presuntiva
Crecimiento levaduriforme sin generación de pseudomicelio	lev s/ psm	<i>C. albicans</i>
Crecimiento levaduriforme con generación de pseudomicelio	lev c/psm	<i>C. dubliniensis</i>

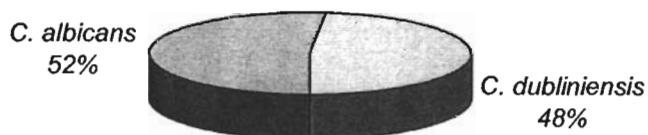
Prueba: Pseudomicelio en agar Alpiste negro		
Condiciones: 72 horas a 28 ° C		
Muestras: Cepas de referencia		
Cepa	Código de identificación	Resultado
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>UME ATCC 90028</i>	lev s/ psm
<i>C. albicans</i> 1525	<i>UADY 1</i>	lev s/ psm
<i>C. albicans</i> x	<i>CFQ 1</i>	lev s/ psm
<i>C. dubliniensis</i> 4	<i>IP 1</i>	lev s/ psm
<i>C. dubliniensis</i> 30	<i>IP 2</i>	lev c/psm
<i>C. dubliniensis</i> 1810	<i>UADY 2</i>	lev c/psm
<i>C. dubliniensis</i> 1910	<i>UADY 3</i>	lev c/psm
<i>C. glabrata</i> x	<i>CFQ 2</i>	lev s/ psm
<i>C. tropicalis</i> x	<i>CFQ 3</i>	lev c/psm
<i>C. krusei</i> x	<i>CFQ 4</i>	lev c/psm
<i>C. parapsilosis</i> x	<i>CFQ 5</i>	lev c/psm

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	75%
Especificidad	57%
Valor predictivo (+)	50%
Valor predictivo (-)	80%

De las 313 muestras, 161 (51.6%) se identificaron como *C. albicans* en base al resultado obtenido en la prueba, las restantes 152 cepas (48.6%) se identificaron como *C. dubliniensis* en base a la observación microscópica (40 X) de generación de pseudomicelio, aún cuando esta prueba ha sido reportada para la observación de clamidoconidias, en este medio no se observó la generación de estas estructuras en ninguna de las 313 cepas probadas.

Relación entre *C. albicans*/*C. dubliniensis* en la prueba de crecimiento en agar Alpiste negro para el total de las cepas



6.3 PRUEBAS CROMOGÉNICAS

6.3.1 AGAR CANDISELECT

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

Clave cromogénica	Identificación presuntiva
Blanco	<i>Candida sp</i>
Azul turquesa claro	<i>C albicans</i>
Azul turquesa oscuro	<i>C. dubliniensis</i>

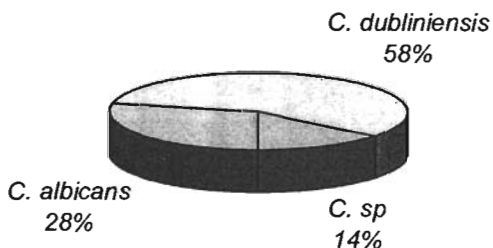
Prueba: Crecimiento en agar Albicans ID				
Condiciones: 48 horas a 28 ° C				
Muestras: Cepas de referencia				
Cepa	Código de identificación	Color de la colonia	Morfología de la colonia	Identificación presuntiva
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	UME ATCC 90028	A. claro	Rugosa	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	UADY 1	A. claro	Cremosa	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFQ 1	A. claro	Cremosa	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	IP 1	A. claro	Cremosa	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	IP 2	A. oscuro	Cremosa	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 2	A. oscuro	Cremosa	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 3	A. oscuro	Cremosa	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	CFQ 2	Blanco	Cremosa	<i>Candida sp</i>
<i>C. tropicalis</i>	CFQ 3	Blanco	Cremosa	<i>Candida sp</i>
<i>C. krusei</i>	CFQ 4	Blanco	Cremosa	<i>Candida sp</i>
<i>C. parapsilosis</i>	CFQ 5	Blanco	Cremosa	<i>Candida sp</i>

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	100%
Especificidad	80%
Valor predictivo (+)	85.7%
Valor predictivo (-)	100%

En esta prueba se observó que 89 (28.4%) muestras se identificaron como *C. albicans*, mientras que 180 muestras (57.5%) del total de 313, presentaron una coloración que permitió identificarlas como *C. dubliniensis* en base al tono azul turquesa oscuro característico de la cepa. En este medio también fue posible evaluar cualitativamente la presencia de otras cepas no-albicans, ya que 44 muestras (14.1%) presentaron una coloración blanca, indicativo esto de la presencia de *Candida sp*.

**Relación entre *C. albicans*/*C. dubliniensis*
en la prueba de crecimiento en agar
Albicans ID para el total de las cepas**



6.3.2 AGAR DIBICROM

A continuación se presenta la clave de lectura y los resultados observados para las cepas de referencia para esta prueba.

Descripción	Clave cromogénica	Identificación presuntiva
Colonias color verde oscuro	Vo	<i>C. albicans</i>
Colonias verde claro	Vc	<i>C. dubliniensis</i>
Colonias verde oscuro con halo azulado	Vo / hga	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>
Colonias color gris azulado	Ga	<i>C. tropicales</i>
Colonias color rosa	R	<i>Candida sp.</i>
Colonias color violeta	Vio	<i>C. tropicalis</i> + <i>C. glabrata</i>

Prueba: Crecimiento en agar DIBICROM Candida			
Condiciones: 48 horas a 28 ° C			
Muestras: Cepas de referencia			
Cepa	Código de identificación	Color de la colonia	Identificación presuntiva
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	UME ATCC 90028	verde oscuro	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	UADY 1	verde oscuro	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFQ 1	verde oscuro	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	IP 1	verde claro	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	IP 2	verde claro	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 2	verde claro	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. dubliniensis</i>	UADY 3	verde claro	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	CFQ 2	Rosa	<i>Candida sp.</i>
<i>C. tropicalis</i>	CFQ 3	Violeta	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. krusei</i>	CFQ 4	Rosa	<i>Candida sp.</i>
<i>C. parapsilosis</i>	CFQ 5	Rosa	<i>Candida sp.</i>

Estos son, los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para esta prueba:

Sensibilidad	100%
Especificidad	100%
Valor predictivo (+)	100%
Valor predictivo (-)	100%

De las 313 muestras, 208 (66.5%) se identificaron como *C. albicans*, 85 de las cepas restantes (27.2%) se identificaron como *C. dubliniensis* en base a la coloración característica verde claro de las colonias. En este medio fue posible identificar posibles mezclas de microorganismos al observar que 35 muestras (16.8%) de las 208 que se identificaron como *C. albicans* presentaron coloración verde oscura acompañada de un halo de tono violeta, lo que nos indica la presencia de más de un microorganismo, muy probablemente *C. tropicalis*. Asimismo, se observaron 20 muestras (6.4%) cuya coloración, según las indicaciones de lectura de la prueba, indica que se trata de cepas de *Candida sp.*

Relación entre *C. albicans*/*C. dubliniensis* en la prueba de crecimiento en agar DIBICROM para el total de las cepas

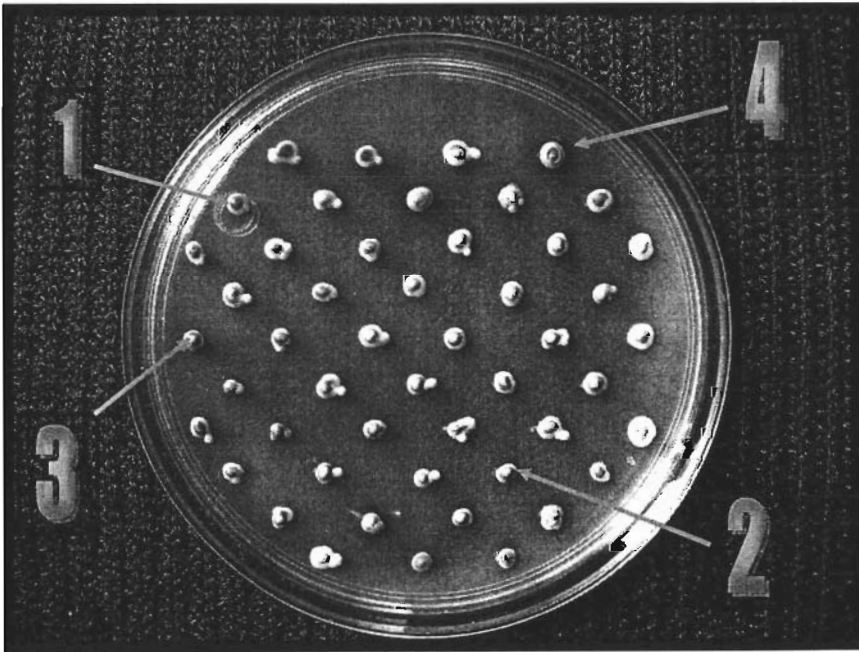
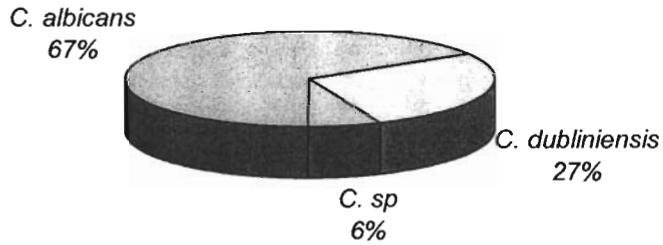
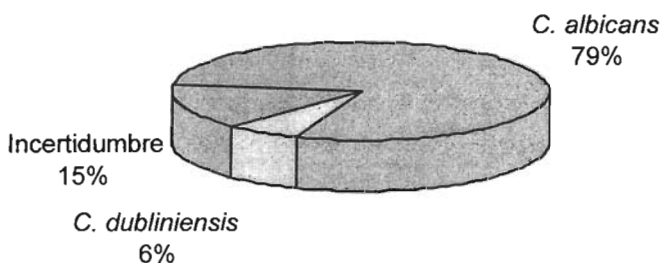


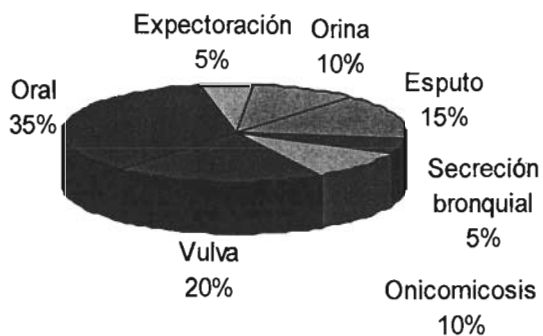
Imagen 3. Aspecto de la placa de DIBICROM agar a las 48 horas de incubación a 28° C, las colonias corresponde a las siguientes cepas: 1) tonalidad verde claro a cepas de *C. dubliniensis*, 2) tonalidad verde oscuro a *C. albicans*, 3) cepas color rosa a *C. glabrata* y 4) en las colonias que tienen un halo de color azul, cabe la posibilidad de que se encuentre *C. tropicalis* en esa muestra

6.4 Resultados globales

Relación encontrada entre *C. albicans*/*C. dubliniensis* en la colección de muestras del Hospital General de México



Tipo de muestras con identificación presuntiva de *C. dubliniensis*



Al observar estos resultado obtenemos 20 cepas (6.4%) que tienen una alta probabilidad de ser *C. dubliniensis*. De la misma manera observamos un porcentaje del 14.7%, que corresponde a cepas que generan una cierta incertidumbre sobre el resultado, debido a que algunas dan positivas para *C. dubliniensis* hasta 3 de las pruebas ensayadas. De las 20 cepas con alta probabilidad de ser *C. dubliniensis*; solo una que corresponde a una muestras vaginal, dio positivas todas las pruebas. El resto de esas cepas pertenecen a muestras: orales (35%), expectoración (5%), orina (10%), esputo (15%), secreción bronquial (5%), vulva (15%) y onicomicosis (10%). Al revisar los resultados de las muestras, se observa la posibilidad de que en un 8% de ellas, el verdadero agente etiológico de la candidosis o un contribuyente importante a la misma, haya sido un miembro de las especies *no-albicans*

VII DISCUSIÓN

Inicialmente se discutirán los resultados por prueba y después de manera global.

Es importante remarcar, antes de hacer el análisis de los resultados, el mantenimiento previo de los cultivos, tanto de agar Sabouraud como de agar Sabouraud con antibióticos (Micosel), de primo-aislamiento de algunas cepas. Esta decisión se tomó en base a la observación visual de pequeñas diferencias morfológicas (cepas suaves o rugosas, de color blanco brillante u opaco) en las cepas provenientes de una misma muestra. El objetivo de este análisis fue evaluar la presencia de manera cualitativa, de otras especies de *Candida* que probablemente se encontraran contribuyendo en la generación de la candidosis en los diferentes especímenes. Al final se observó una presencia probable de únicamente el 8% de otras especies, identificadas únicamente como *Candida spp*, pero que nos orientan un poco a reflexionar en las complejas interacciones entre las diversas cepas, junto con los factores predisponentes del paciente, para desarrollar la enfermedad.

Otro punto para discutir es la realización de varios pases o subcultivos de las cepas tanto en caldo de Sabouraud como en placas de agar Sabouraud, con el simple objetivo de mantenimiento de ellas, esto antes de someterlas a las diversas pruebas, observando inicialmente una gran disparidad en los tiempos de crecimiento, sobretodo en las cepas con mayor tiempo de almacenamiento, algunas de las cuales al principio tardaron hasta 5 o 7 días en comenzar a desarrollar crecimiento en los medios. Este punto nos indica una probabilidad muy alta, de que las condiciones de almacenamiento en agua estéril a temperatura ambiente, siendo muy económica y fácil de realizar, no es la más adecuada para el mantenimiento por tiempo prolongado, y que las cepas deben previamente activarse en diversos medios con fuentes de carbono antes de realizar las pruebas de búsqueda. Con base a lo anterior, se tomó la decisión de realizar

varios pases tanto en caldo como en medio sólido para la re-activación metabólica de las cepas e intentar que se encontraran en las mejores condiciones posibles antes de correr las diversas pruebas. Comparando nuestra problemática de almacenamiento, encontramos que Odds ⁽⁴²⁾ utilizó en un estudio retrospectivo, una gran cantidad de cepas mantenidas bajo estas condiciones y no hace una referencia directa de haber tenido problemas con el almacenamiento tan prolongado (algunas de sus cepas se encontraban almacenadas desde los años 70), es más, en un estudio previo ⁽⁹⁰⁾, refiere que para las levaduras la viabilidad es de hasta el 96% con 10 años de almacenamiento en agua destilada estéril a temperatura ambiente; sin embargo en ese estudio retrospectivo se menciona que se incubaron las cepas en CHROMagar a 37° C de 4 a 6 días y se observaron anomalías en el color; esto nos permite cuestionar si esas anomalías son o no debidas, a que las cepas tenían sus capacidades metabólicas incompletas por el almacenamiento tan prolongado. Revisando la información existente, encontramos que las condiciones de almacenamiento ideales sugeridas por algunos autores para levaduras ^(26, 27, 29, 36), son a -70° C en 10% de glicerol, condiciones que en nuestro medio son complicadas de mantener, debido a la insuficiencia de las instalaciones en la mayoría de los laboratorios microbiológicos de rutina.

Otro punto importante para realizar estos pasos previos, fue observar si las cepas se encontraban contaminadas por bacterias o por hongos anemófilos, lo cual se pudo comprobar en algunas de las cepas, esto nos permitió eliminar los microorganismos contaminantes antes de realizar las pruebas, lo que nos hubiera ocasionado problemas con la lectura de las mismas.

La inoculación de cada una de las pruebas, se realizó por picadura (pruebas cromogénicas) y por estría (en pruebas térmicas y morfológicas) con asas microbiológicas, a diferencia de los reportes internacionales donde los inóculos son cuantitativos y referidos a 100 µL de una suspensión de la cepa equivalente a 3 en la escala de Mcfarland ^(26,57), lo que ayuda en cierta medida en la lectura de

las pruebas para observar diferencias en cuanto a la cantidad de crecimiento del microorganismo en los medios; esto no fue posible de realizar en este trabajo debido a lo poco práctico que resultaba realizar el procedimiento para las 324 muestras totales.

Como último comentario en las aclaraciones previas, es discutir el hecho de que las condiciones en las que se realizaron las pruebas en esta investigación no fueron las ideales, como se sugiere en los reportes internacionales, debido a que por las condiciones imperantes en el laboratorio de micología de rutina, no se cuenta con todo el equipo necesario para llevar a cabo las pruebas de manera ortodoxa. De ahí que se tomó la decisión de realizar inóculos no cuantitativos y con el material rutinario (asas microbiológicas), y de llevar a cabo la incubación de las pruebas a 28 ° C (excepto para 42 y 45 ° C) y no a 37° C, condiciones que son imperantes en los laboratorios de micología en este país y condiciones en las que tendríamos que llevar a cabo las pruebas al decidir aplicarlas de manera rutinaria. Si bien es cierto que estos hechos le restan validez a nuestra investigación, al no ser completamente equiparables nuestros resultados con los obtenidos a nivel internacional, pensamos que al final nuestro trabajo sirvió para observar si mediante algunas pruebas fenotípicas era posible sospechar la presencia de *C. dubliniensis* y como experiencia para reflejar los pormenores de las pruebas al intentar aplicarlas a la rutina del laboratorio de micología. Para finalizar, debemos mencionar el hecho de que la manera de validar completamente estos resultados es aplicando técnicas de biología molecular al total de las muestras y concluir de manera definitiva cuantas cepas son *C. dubliniensis* y cuantas son *C. albicans*, de esta manera obtendremos inmediatamente la cantidad de falsos positivos y negativos para estas pruebas bajo esas condiciones.

A) Pruebas térmicas (crecimiento a 42° C y 45° C)

El éxito de las pruebas térmicas esta basado en la aparente falta de una proteína (proteína A) en la pared celular de *C. dubliniensis*; lo que en teoría nos explica como funciona, de modo que al tener una pared celular defectuosa e inestable, las cepas de ésta serían incapaces de crecer al aumentar la temperatura más allá de los 37° C; sin embargo, los resultados obtenidos para las cepas de referencia son poco claros en ese aspecto, ya que un par de cepas de *C. albicans* no crecieron y un par más de *C. dubliniensis* lo hicieron, por lo cual los resultados para el resto de ellas son poco confiables. El principal problema con esta prueba ha sido al momento de comparar los valores de sensibilidad reportados a nivel internacional con los calculados para este experimento, ya que en la prueba de 42° C, la sensibilidad es muy baja y la especificidad es apenas del 50 %, lo cual la convierte en una prueba dudosa para realizar una búsqueda de esta cepa. Otro problema es lo subjetivo de la interpretación entre crecimiento pobre y regular, básicamente provocado por el hecho de no haber realizado inóculos cuantitativos que nos pudieran orientar en ese sentido.

Al realizar la prueba a 45° C, observamos un comportamiento muy parecido a la prueba a 42° C, aun cuando el grado de sensibilidad aumentó de manera considerable para esta prueba, los problemas son similares y el porcentaje de presencia de *C. dubliniensis* parece ser alto. En la mayoría de los reportes internacionales ^(26, 37, 50), se indica que estas pruebas, sobre todo a 45° C tiene una alta efectividad para distinguir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, donde es muy clara la diferencia entre ellas debido a la restricción o no de crecimiento en los medios de cultivo pero hay algunos artículos donde sí se reportan marcadas discrepancias, ya que cepas identificadas como *C. albicans* mediante pruebas genómicas, no crecieron a 45° C ^(29, 38, 39, 41), esto varía de algunos reportes a otros, siendo generalmente un porcentaje pequeño de cepas de *C. albicans* el que falla en el crecimiento a esta temperatura, pero que nos indica que no podemos dar el carácter de definitiva a esta prueba, sino mantener sus resultados como de

alta presuntividad. Lo anterior nos orienta un poco en los resultados que obtuvimos, ya que algunas o muchas de las cepas que crecieron muy poco o no crecieron a 42° C o 45° C y que estamos identificando como *C. dubliniensis*, deben ser cepas de *C. albicans* que por alguna razón no desarrollaron en los medios a esas temperaturas. Para analizarlo podemos pensar en que se trata de cepas atípicas de *C. albicans* que pudieran tener defectuosa su pared celular y por lo cual se ve afectado su metabolismo y desarrollo al mantener una temperatura de incubación alta. Al observar los resultados globales, vemos que algunas de las cepas que crecieron sin ningún problema en estos medios y que se identificaron como *C. albicans*, en las pruebas posteriores dieron resultados congruentes para *C. dubliniensis*, lo que indica que los problemas en éstas pueden ser en ambos sentidos, es decir, cepas que crecen en estos medios a esas temperaturas y cepas que dejan de crecer, y que de manera irremediable nos llevarían a realizar una mala identificación (*C. albicans* cuando se trata de *C. dubliniensis* y viceversa) al montar la prueba de manera rutinaria en el laboratorio, esto implica que NO es una prueba definitiva sino orientadora en la búsqueda de *C. dubliniensis*

B) Pruebas morfológicas (agar Cerelac + Tween 80 y agar Alpiste negro)

En la prueba de crecimiento en agar Cerelac + Tween 80, lo primero es observar que el medio de cultivo nos dio una generación muy buena de clamidoconidias, lo que nos permitió una clara diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, ya que las cepas de la primera se observan como colonias de levaduras con pseudohifas más clamidoconidias únicos y generalmente terminales, mientras que las colonias de *C. dubliniensis* se observan con levaduras, pseudohifas y clamidoconidias múltiples en grupos que van desde 3 hasta 5 o 6; debido a lo anterior, la diferencia entre estas cepas es clara y fácil de precisar, además la generación de éstas estructuras es muy rápida, ya que se obtienen entre 24 y 48 horas, permitiendo una lectura más rápida que en el medio de harina de maíz habitualmente usado para ello. La otra situación a considerar es el hecho de que se presentaron muchas cepas que sólo dieron levaduras, o que

llegaron a generar pseudohifas sin clamidoconidias, esto nos lleva a pensar que es muy probable que las condiciones de almacenamiento de las cepas, hayan afectado de manera negativa las capacidades metabólicas de los microorganismos; esto explicaría esa presencia abundante de cepas incapaces de generar clamidoconidias y que afectaría una buena lectura de esta prueba. En los reportes internacionales, la prueba es realizada con medio de harina de maíz suplementado con 1% de tensoactivo y realizando la lectura a las 72 horas, en estos reportes ^(26, 29, 39), los resultados para esta prueba, y comprobados mediante pruebas genómicas, indican que tiene errores de identificación para *C. dubliniensis*, ya que algunas de esas cepas no generan clamidoconidias múltiples, misma situación que llegamos a enfrentar nosotros con algunas cepas, y sólo encontramos un reporte donde una cepa de *C. albicans* generó abundantes clamidoconidias ⁽²⁹⁾. Esta prueba, a pesar de que es fácil de realizar en la rutina y de fácil lectura, no es muy utilizada a nivel internacional, debido a que genera una cierta desconfianza el hecho de que no siempre se observan estas estructuras en cepas que posteriormente son identificadas como *C. dubliniensis* mediante estudios genómicos; sin embargo, si la prueba es realizada con cepas de primo-aislamiento, la generación de clamidoconidias múltiples puede tener un alto porcentaje de poder predictivo en este medio de cultivo. Este estudio tampoco es definitivo, sino que se trata de una prueba cuyo valor es presuntivo para la búsqueda de *C. dubliniensis*.

La prueba de crecimiento en agar alpiste negro, es una prueba que se utiliza de rutina en los laboratorios de Micología para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. neoformans*, por la capacidad de éste microorganismo de producir colonias de color oscuro en este medio, debido a la producción de pigmentos de tipo melanínico, y es una alternativa económica y fácil de realizar del medio comercial Staib agar donde la prueba esta descrita para la generación en 48-72 horas, de pseudohifas y clamidoconidias en *C. dubliniensis*; pero no para *C. albicans*, microorganismo que solamente genera crecimiento levaduriforme durante el mismo tiempo de incubación (72 horas a 30 ° C), en los trabajos de Staib et al ⁽⁵⁹⁾

donde se reporta esta prueba, la describen con una confiabilidad alta (90%). En este trabajo, ninguna de las 313 cepas utilizadas generó clamidoconidias en este medio. Aquí podemos discutir algunas posibles causas, la primera es que el medio comercial esta adicionado con creatinina y KH_2PO_4 , ingredientes que no utilizamos para nuestro medio de alpiste negro de manera rutinaria, otro punto es la temperatura de incubación la cuál es llevada a cabo a 30°C y la temperatura que utilizamos nosotros fue a 28°C , lo que probablemente influyó para los resultados que obtuvimos. Esto nos lleva a pensar que esta prueba no se realizó de manera adecuada al no obtener el resultado esperado, ya que si bien es cierto que obtuvimos generación de pseudomicelio en las cepas de *C. dubliniensis* y no en las de *C. albicans*, las cepas de *Candida spp* también generaron pseudomicelio (excepto *C. glabrata*); esto introduciría una gran incertidumbre si se monta la prueba de manera rutinaria porque nos llevaría a confundir cepas de *Candida spp* con cepas de *C. dubliniensis* y cepas de *C. albicans* con cepas de *C. glabrata*, si utilizamos el medio para el primo-aislamiento de los microorganismos, lo que la convierte en la prueba más subjetiva de todas. Esta situación puede explicarnos la relación entre *C. albicans/C. dubliniensis* tan alta encontrada en la realización de esta prueba (50/50), la cual es muy poco probable de ser cierta de acuerdo a los reportes de presencia de *C. dubliniensis* (entre 4 y 10% del total de muestras) en el mundo ^(29, 36, 40-43). Existe otra prueba alternativa al agar Staib, la cual utiliza extracto de semillas de girasol (*Helianthus annuus*) y que asegura un 100% de exactitud en la discriminación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* ⁽⁵³⁾, en este reporte, indican que la primera desarrolla como levaduras sin pseudomicelio y la segunda con pseudomicelio, resultado que es similar al que obtuvimos nosotros, también mencionan la producción de clamidoconidias en algunas de las cepas de *C. dubliniensis* pero no en todas, sin embargo en ninguno de los reportes antes mencionados ^(53, 59), indican la evaluación de otras especies de *Candida spp*, en esos medios, por lo que no tienen presente que pueden tener errores de identificación. Por los resultados que nosotros obtuvimos, parece que es una prueba buena para la discriminación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, siempre y cuando no la utilicemos como prueba de primo-aislamiento por la confusión en la

lectura del resultado con el resto de especies, por lo que debe ser utilizada como una prueba complementaria para la búsqueda de *C. dubliniensis*.

C) Pruebas cromogénicas (agar Albicans ID y agar DIBICROM)

Estas pruebas cromogénicas son las de mayor sensibilidad y especificidad y funcionan para la búsqueda de cepas tipo *albicans*; ya que las cepas no-*albicans*, al mostrar un color diferente, son fáciles de distinguir. El primer problema radica en la lectura de las cepas de tipo *albicans*, ya que resulta muy subjetiva la percepción del tono de color (claro u oscuro) que nos distingue entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En este sentido, Godoy et al ⁽⁵⁷⁾, reportan una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% y, resultados que son parecidos a los nuestros, sin embargo, ellos reportan haber obtenido falsos positivos al obtener la misma coloración en el 60 % de sus cultivos de *C. rugosa* (3/5) y en el 18% de los de *C. tropicalis* (3/17); esta situación no la observamos nosotros, ya que todas nuestras cepas de referencia pertenecientes a cepas de *Candida* no-*albicans* generaron coloración típica de *Candida sp.*

Al observar nuestros resultados nos damos cuenta de que existe una gran cantidad de cepas generando resultados positivos para *C. dubliniensis* (58%), proporción que resulta muy elevada y parece no ser cierta. Es aquí donde podemos indicar la presencia de un segundo problema con esta pruebas, el cual radica en que al funcionar debido a la interacción de enzimas de las cepas con los compuestos cromógenos que contienen los medios, su adecuado funcionamiento depende en gran medida de que las cepas tengan sus capacidades metabólicas completas y de que los medios se encuentren en perfectas condiciones (almacenamiento y caducidad), de lo contrario los resultados se ven afectados. Por esta razón debe tenerse precaución al aceptar los resultados generados en esta prueba para las cepas almacenadas en colecciones de muestras, ya que pensamos que, como en nuestro caso, el almacenamiento por dos o tres años en agua destilada a temperatura ambiente, a diferencia de la opinión de Odds ⁽⁹⁰⁾, es

muy probable que altere a las cepas en sus capacidades enzimáticas y por lo tanto, si no se lleva una adecuada reactivación metabólica previa a esta prueba, los resultados se encontrarán alterados, generando falsos positivos o falsos negativos en la búsqueda de *C. dubliniensis*.

En caso de la prueba en agar DIBICROM, encontramos una sensibilidad y una especificidad del 100% en las cepas de referencia, resultados que no podemos comparar con los reportes internacionales de Tintelnot et al⁽²⁶⁾, Odds⁽⁴²⁾, De Laet et al⁽³⁶⁾ ó Giammanco⁽⁴⁰⁾, ya que todos ellos reportaron resultados globales en agar CHROM después de confirmarlos como falsos positivos o negativos con técnicas de biología molecular, situación que no fue posible realizar en este caso, pero que es necesaria para confirmar el porcentaje obtenido de *C. dubliniensis* en esta prueba (27%). Por último, en cuanto a la observación hecha en los resultados de la existencia de cepas que habían generado un halo de color violeta, y donde sugerimos la presencia de más de un microorganismo (*C. tropicalis*, en este caso), encontramos que Duane et al⁽⁷⁹⁾ tuvieron una situación similar al observar colonias de *C. tropicalis* que generaron alrededor de ellas, un pigmento púrpura difusible en el medio; esto nos orienta en el sentido de que es muy probable que tengamos razón al considerar que en algunas de nuestras muestras tenemos una mezcla de microorganismos.

Por último, sólo se consideraron las 20 cepas cuyos resultados en las pruebas fueron positivos para *C. dubliniensis* en al menos cuatro de las seis pruebas realizadas, lo que nos indica una probable presencia de este microorganismo en el 6.4% del total de las muestras. Este resultado tiene coherencia con los reportes a nivel internacional^(29, 36, 40-43), donde los resultados van desde el 1% hasta el 17%; sin embargo, en nuestra investigación queda un porcentaje considerable de cepas (14.7%) cuyo resultado es muy ambiguo, ya que presentaron positivas tres de las seis pruebas realizadas, lo que nos indica una cierta incertidumbre de haber dejado pasar algunas cepas que en realidad son *C. dubliniensis* pero que por los resultados estamos considerando como *C. albicans*, o de lo contrario los casos,

cepas de *C. dubliniensis* que estamos evaluando como *C. albicans* debido a las condiciones de las muestras y de la realización de las muestras.

Es necesario mencionar el hecho de que en la rutina pueden identificarse de manera errónea como *C. albicans* a otras especies de tipo no-*albicans*, en el entendido de que desorienta la observación directa al microscopio de blastoconidias y/o pseudohifas y/o de las características de la cepa en los medios de cultivo convencionales. En este sentido, los medios cromogénicos son prácticos y evitan la pérdida de tiempo en la identificación completa de los microorganismos, lo que funciona bien en la rutina; sin embargo, es muy importante hacer énfasis en lo siguiente: en este trabajo se observa que la utilización de estos medios en investigaciones retrospectivas debe llevarse a cabo con cautela, debido a que las condiciones de mantenimiento de las cepas pueden alterar parcial o completamente las capacidades metabólicas de las cepas, y ocasionar lecturas falsas (negativas o positivas). En este trabajo en particular se encontraron 25 muestras (8%) cuyos resultados en algunas pruebas orientadoras (agar Cerelac +Tween 80 y los medios cromogénicos) dieron positivo para cepas de tipo no-*albicans*, estos resultados deben tomarse con un poco de precaución debido a que pueden haber sido ocasionados por ese posible mal estado metabólico de las cepas y en realidad ser falsos negativos en esas pruebas. Pero de ser cierto, debe buscarse otras metodologías para que desde el primo-aislamiento se identifique de manera adecuada. Esto puede parecer de poca importancia a nivel diagnóstico, sobretodo porque el tratamiento es igual para todas las especies de *Candida* cuando se encuentran como agente etiológico de enfermedad, pero en los últimos años se ha observado de manera cada vez más frecuente un aumento en los casos de candidosis cuyas cepas son cada vez más resistentes a los tratamientos, de ahí la importancia de establecer claramente cual es el agente causal de la enfermedad mediante rutinas diagnósticas que nos permitan detectar a estos agentes desde la primera toma de muestras

Por último, sólo resta mencionar que este trabajo ha servido para observar que en la búsqueda de *C. dubliniensis*, las pruebas fenotípicas solamente nos sirven para indicar su presencia como agente etiológico en enfermedad de manera presuntiva, ya que su relación a nivel genético con *C. albicans* se ha revelado tan cercana, que resulta muy complicado distinguir a una de la otra a nivel fenotípico. Lo que nos lleva a concluir que la única manera de distinguir entre ellas con un porcentaje mayor de confiabilidad y sensibilidad es mediante las pruebas de genética molecular, sin embargo, la relación genética entre estas especies es tan pequeña que nos lleva a plantear la duda si en realidad *C. dubliniensis* es una especie nueva con características y/o propiedades diferentes a *C. albicans* o si se trata de una variedad de *C. albicans* mejorando sus capacidades de defensa contra las terapias de tratamiento. Es en un caso como éste en donde la Biología Molecular da la precisión adecuada en la identificación.

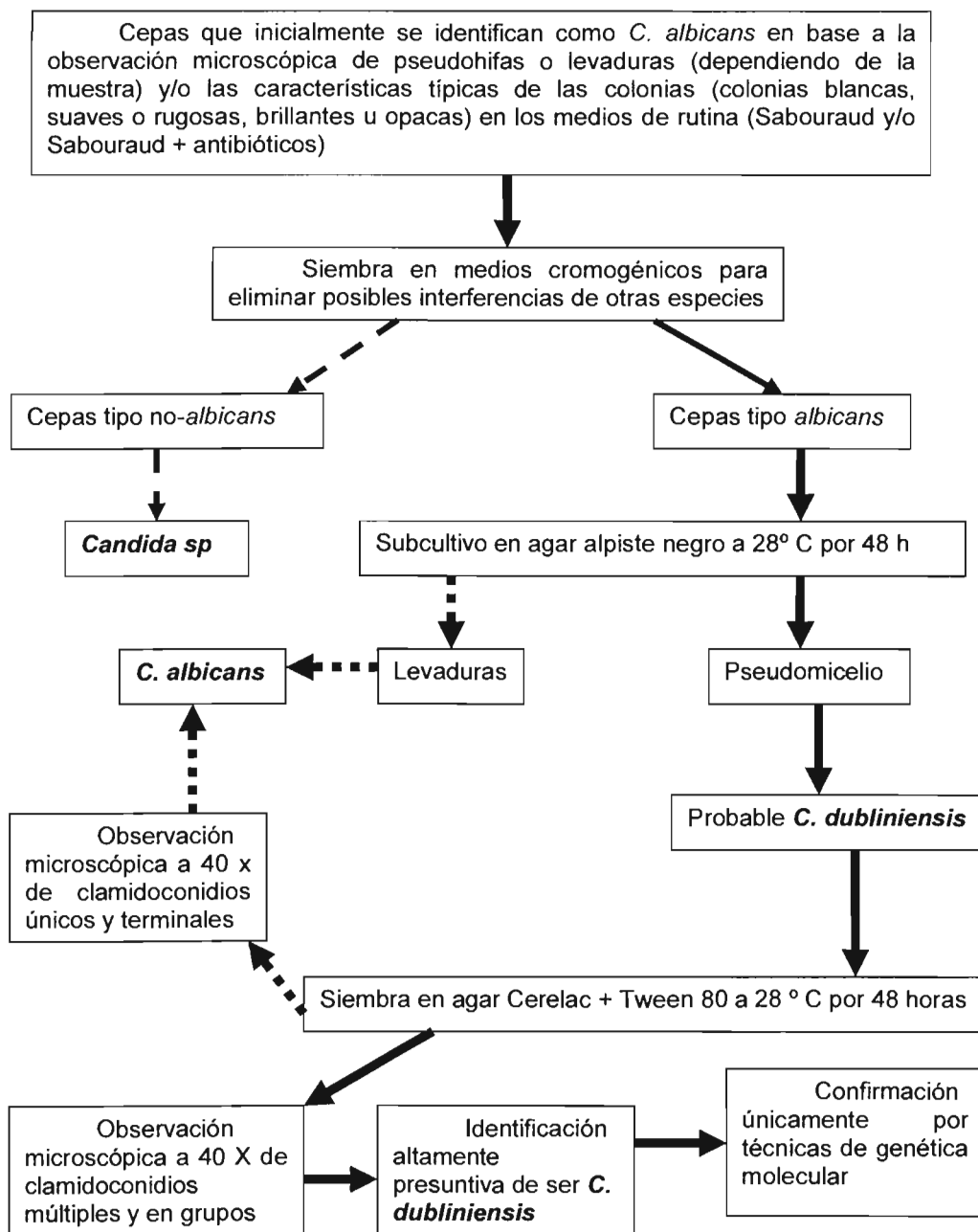
VIII CONCLUSIONES

Para este trabajo de investigación se tienen las siguientes conclusiones:

1. No se recomienda el almacenamiento en agua estéril a temperatura ambiente por tiempos más allá de seis meses.
2. Si se tienen cepas almacenadas en agua estéril a temperatura ambiente, es necesario someterlas a una serie de pases en medios nutritivos para favorecer su reactivación y estabilización metabólica.
3. Las pruebas térmicas son fáciles de realizar y económicas, pero se requieren de incubadoras cuya temperatura pueda ser controlada y monitoreada constantemente.
4. Las pruebas térmicas tienen una baja confiabilidad y reproducibilidad bajo condiciones de trabajo (no condiciones de laboratorio sumamente controladas).
5. Las pruebas térmicas se consideran subjetivas, debido a que se debe reportar crecimiento pobre y regular.
6. El uso de métodos que nos permitieran realizar inóculos cuantitativos, eliminaría problemas en los resultados de las pruebas, debido a diferencias en las cantidades de inóculo colocados en cada medio de cultivo. El uso de estos métodos para realizar inóculos cuantitativos es poco práctico en la rutina diaria de los laboratorios de microbiología médica, sobretodo si se trabaja con grandes cantidades de muestras.
7. La prueba de crecimiento en agar Alpiste negro presenta una identificación muy ambigua, y no nos permite distinguir si se encuentra alguna otra especie, debido a que el pseudomicelio y las levaduras son características de otras especies de *Candida*.
8. A pesar de los resultados de confiabilidad para la prueba de crecimiento en agar Cerelac + tween 80, resulta una prueba económica y cuyo resultado es fácil de observar e interpretar, además de que al trabajar con cepas en

-
- óptimas condiciones, la generación de clamidoconidios se obtiene en menos de 48 horas.
9. Las pruebas cromogénicas son excelentes para la búsqueda de cepas de tipo *C. albicans* desde el primo-aislamiento, además de que tienen la ventaja de que la lectura entre ésta y las no-*albicans* es muy sencilla, debido a la generación de colores depende de cada especie.
 10. Las pruebas cromogénicas tienen su punto débil en lo subjetivo de la interpretación de los tonos de los colores que permitirían distinguir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.
 11. Otro punto a considerar en el uso de los medios cromogénicos es el alto costo que tienen y la poca disponibilidad que se tiene de ellos en nuestro medio.
 12. Mediante el uso de pruebas fenotípicas fue posible evaluar de manera presuntiva, la presencia de *C. dubliniensis* en la colección de muestras del Laboratorio de Micología del Hospital General de México.
 13. Mediante esta serie de pruebas obtuvimos que un 6.4% del total de las cepas, que habían sido identificadas como *C. albicans* por métodos de rutina, se re-identificaron como *C. dubliniensis*.
 14. De esas 20 cepas (6.4%), el 35% correspondieron a muestras orales y el resto presenta una topografía clínica interesante de investigar (esputo, orina, vulva y onicomycosis).
 15. La búsqueda intencionada *C. dubliniensis*, debe incluirse en la rutina de los laboratorios de microbiología para detectarla desde el primo-aislamiento, por lo cual debe continuarse con la investigación para encontrar nuevas pruebas fenotípicas que sean económicas, confiables y reproducibles.
 16. Debido a la proximidad genética entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, es muy importante dejar en claro que la identificación mediante pruebas fenotípicas solamente tiene el carácter de presuntiva.
 17. La identificación definitiva debe hacerse mediante análisis del material genético de estos microorganismos.

18. A continuación se presenta el algoritmo sugerido para la identificación de *C. dubliniensis* en la rutina diaria.



X APÉNDICE A

Medios de cultivo especiales:

1. Agar Alpiste negro

Fórmula:

Alpiste negro (*Guizotia abyssinica*) pulverizado 70 g

Cloramfenicol 50mg

Agar bacteriológico 20g

Agua destilada 1000 mL

Preparación: remoje el alpiste negro en 1 L de agua, hervir durante 30 minutos; posteriormente filtrar en gasa y papel filtro. Aforar a 1 L de agua. Esterilizar en autoclave a 110° C por 15 minutos.

2. Agar Cerelac + Tween 80

Fórmula:

Cerelac (*) 14g

Agar bacteriológico 10g

Cloramfenicol 10mg

Agua destilada 990 mL

Tween 80 (1%) 10 mL

Preparación: se agrega el Cerelac en 500 mL, se deja reposar por 5 minutos, se agita y se pone a fuego lento, se deja hervir por 5 minutos y posteriormente se filtra en gasa, se adicionan el cloramfenicol y el Tween 80, se afora a 1 L y se esteriliza a 121° C por 15 minutos.

XII BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas R. Micología Médica ilustrada. México D. F.: McGraw Hill, 2003: 187-203.
2. Bonifaz, A. Micología Médica básica. México D. F.: Méndez Editores, 2002: 297-329.
3. Rippon, J. Micología Médica. México: Interamericana McGraw Hill, 1990: 574-628.
4. Arenas, R, Bonifaz A, Padilla C, et al. Revisión del 1^{er}. Consenso Nacional de prevención, diagnóstico y Tratamiento de Micosis Superficiales. México D. F.: TOCA, editores, 2001:26-33.
5. López-Martínez R, Méndez L. Procedimientos para el diagnóstico del laboratorio. México D. F.: Trillas, 1995.
6. Sullivan D, Coleman D. Candida dubliniensis: Characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36:329-334.
7. Sullivan D, Moran G, Donnelly S, et al. Candida dubliniensis: An update. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16:72-76.
8. Gilfillan G, Sullivan D, Haynes K, et al. Candida dubliniensis: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 1998; 144:829-838.
9. *Candida dubliniensis* www.doctorfungus.org
10. Hazen K. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:462-478.
11. Coleman D, Sullivan D, Bennette D, et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, Candida dubliniensis. *AIDS* 1997; 11:557-567.
12. Silva V, Díaz J, Febre N, et al. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infectol* 2002; 19 Suppl 2:149-156.
13. Giusiano G, Mangiaterra M, De Luca G, et al. Hongos levaduriformes emergentes y su sensibilidad antifúngica en pacientes pediátricos hospitalizados. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 2000

-
14. Rivas P. Pruebas de sensibilidad antimicótica en aislamientos clínicos de *Candida* spp. de pacientes con cáncer. *Rev Colomb Cancerol* 2004; 8:22-28.
 15. Guinet R, Chanas J, Goullier A, et al. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1983; 18:443-4.
 16. Lloret C, Gutiérrez O, Borrell Nuria. *Candida lusitanae*. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca. <http://www.seimc.org/control/revi/Mico/clusitanae.htm>.
 17. Chaffin WL. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*. Identification, Function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:130-180.
 18. Sturtevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesions: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:90-97
 19. Niesters H, Goessens W, Meis J, et al. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993; 31:904-910.
 20. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>
 21. <http://www.clinical-mycology.com>
 22. <http://albicansmap.ahc.umn.edu/>
 23. Saporito I, Fonzi W. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1995; 15:601-613.
 24. Castrillón L, Palma A, Padilla C. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Rev Mex Dermatol* 2005; 49:12-25.
 25. <http://www.micologyonline.com>
 26. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, et al. 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1599-1608.
 27. Ramage G, Vande K, López-Ribot J. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3234-3240.

-
28. Hazen K, Wu J, Masuoka J. 2001. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun* 2001; 69:779-786.
 29. Kirkpatrick W, Revankar S, Mcatee R, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3007-3012.
 30. Gee S, Joly S, Soll D, et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. *J Clin Microbiol* 2002; 40:556-574.
 31. Trépanier H, Jean V, Boily M, et al. One-hour detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in blood samples using the smart cycler. *Infectious Diseases research center of Laval University and IDI, Sainte-Foy, Québec, Canada*.
 32. Ramón A, Porta A, Fonzi W. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol* 1999; 181:7524-7530.
 33. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2404-2412.
 34. White T, Holleman S, Dy F, et al. Resistance mechanism in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1704-1713.
 35. Pinjon E, Moran G, Jackson C, et al. Molecular mechanisms of Itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2424-2437.
 36. De Laet Sant'Ana, Mariano P, Pípolo E, et al. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:533-538.

-
37. Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, et al. Recovery of *Candida dubliniensis* from Non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J Clin Microbiol* 2000; 38:170-174.
 38. Fotedar R. *Candida dubliniensis* at a University hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1907-1911.
 39. Jabra –Rizk M, Baqui A, Kelley J, et al. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol* 1999; 37:321-326.
 40. Giammanco G, Pizzo G., Pecorella S, et al. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol Immun* 2002; 17:89-94.
 41. Jabra-Rizk M, Falkler W, Merz W, et al. Retrospective identification and characteristics of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2423-2426.
 42. Odds F, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2869-2873.
 43. Kim J, Garofalo L, Blecker-Shelly D, et al. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3354-3357.
 44. Moran G, Sullivan D, Henman M, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41:617-623.
 45. Martínez M, López-Ribot J, Kirkpatrick W, et al. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3135-3139.

-
46. Hartz S, Pipolo E, De Laet P, et al. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 85-86.
 47. Lees E, Barton R. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 13-17.
 48. Pincus D, Coleman D, Pruitt W, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3533-3539.
 49. Gales A, Pfaeller M, Houston A, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of Xylose and α -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3804-3808.
 50. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, et al. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2093-2095.
 51. Kyoungg-Ho L, Woon-Seob S, Donghwa K, et al. The presumptive identification of *Candida albicans* with germ tube induced by high temperature. *Yonsei Medical Journal* 1999; 5: 420-424.
 52. Donghwa K, Woon-Seob S, Kyoungg-Ho L, et al. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39° C. *Yeast* 2002; 19: 957-962.
 53. Mosaid A, Sullivan D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4787-4789.
 54. Kirkpatrick W, Lopez-Ribot J, Mcatee R, et al. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol* 2002; 38: 902-904.
 55. Mosaid A, Sullivan D, Salkin I, et al. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate agar. *J Clin Microbiol* 2001; 39:323-327.

-
56. Fotedar R, Al-Hedaithy S. Identification of chlamyospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. *Mycoses* 2003; 46:96-103.
 57. Godoy P, Almeida L, Lopes A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 197-199.
 58. Yücesoy M, Esen N, Yulug N. Use of Chromogenic tube and methyl blue-Sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. *Kobe J Med Sci* 2001. 47:161-167.
 59. Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation on Staib agar a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 1999; 42: 521-524.
 60. Mosca C, Moragues M, Llovo J, et al. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1259-1262.
 61. Swarajit B, Yokoyama K, Wang Li, et al. Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1600-1603.
 62. Guzmán A. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chil Inf* 2004; 21:39-47.
 63. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1157-1159.
 64. Rubio C, Gil J, Ramírez I, et al. Comparison of results obtained by testing with three different agar media by the NCCLS M27-A method for In Vitro testing of Fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2665-2668.
 65. Patterson T, Kirkpatrick W, Revankar S, et al. Comparative evaluation of macrodilution and chromogenic agar screening for determining fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1996;34:3237-3239
 66. Heelan J, Sotomayor E, Coon K, et al. Comparison of the rapid yeast plus panel with the API 20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1443-1445.

-
67. Calera J, Xiao-Jiang Z, Calderone R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* 2000; 68: 518-525.
 68. Baumgartner C, Freydiere A, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 454-456.
 69. Horvath L, Hospenthal D, Murray C, et al. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2629-2632.
 70. Nimi K, Shepherd M, Cannon R. Distinguishing *Candida* species by β -N-acetylhexosaminidase activity. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2089-2097.
 71. Sancak B, Rex J, Paetznick V, et al. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41:489-491.
 72. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, et al. Evaluation of *Candida* ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1647-1649.
 73. Pfaeller M, Messer S, Karlsson A, et al. Evaluation of the E test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2586-2589.
 74. Yunus M, Moosa S, Sobol Jack, et al. Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:161-167.
 75. Perea S López- Ribot J, Wickers B, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1695-1703.
 76. Pinjon E, Moran G, Jackson C, et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2424-2437.

-
77. Cooke V, Miles R, Price R, et al. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *App Environ Microbiol* 2002; 68:3622-3627.
 78. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, et al. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3793-3795.
 79. Hospenthal D, Murray C, Beckus M, et al. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4768-4770.
 80. Heitz H, Küssner A, Thanos M, et al. Phenotypic and Genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2462-2465.
 81. Goldschmidt M, Fung D, Grant R, et al. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1095-1099.
 82. White T, Holleman S, Dy F, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1704-1713.
 83. Calvet H, Yeaman M, Filler S. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential In Vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 535-539.
 84. Fitzgerald D, Coleman D, O'Connell B. Susceptibility of *Candida dubliniensis* to salivary histatin 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 70-.76.
 85. Moran G, Sullivan D, Morschhäuser J, et al. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2829-2841.
 86. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2002; 38: 4626-4628.
 87. Beighton D, Ludford R, Clark D, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3
 88. Blignaut E, Pujol C, Joly S, et al. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1838-1842.

89. Ribbons D. *Methods in Microbiology*. Vol. 3A. Londres. Academia, 1970: 170-194.

90. Odds, F. Long- term preservation of pathogenic yeasts under distilled water. *J Med Vet Mycol* 1991; 29:413-415.