



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de *Candida dubliniensis* en aislados obtenidos de pacientes
pediátricos del INP utilizando 3 métodos de diferenciación fenotípicos.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ROBERTO JAVIER CHAVIRA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Gutiérrez Ramos Abel

VOCAL: Bonifaz Trujillo José Alejandro

SECRETARIO: García Camacho Gerardo

SUPLENTE 1: Bonilla Espinosa Eduardo

SUPLENTE 2: Ruiz Villafán Beatriz

Sitio en donde se desarrolló la tesis:

Laboratorio de Parasitología y Micología. Instituto Nacional de Pediatría.
Insurgentes Sur 3700, Letra C, Delegación Coyoacán, Distrito Federal CP. 04530

ASESOR DEL TEMA: García Camacho Gerardo _____

SUPERVISOR TÉCNICO: Sanchez Figueroa Dorian _____

SUSTENTANTE: Chavira Martínez Roberto Javier _____

INDICE

1.-RESUMEN.....	4
2.-INTRODUCCIÓN.....	7
3.-ANTECEDENTES.....	9
3.1 Candidosis.....	9
3.1.1 Epidemiología.....	9
3.1.2 Patogenia.....	10
3.1.3 Aspectos Clínicos.....	11
3.2 Candida.....	12
3.2.1 Clasificación Taxonómica.....	12
3.2.2 <i>Candida albicans</i>	12
3.2.2.1 Factores de patogenidad.....	14
3.2.3 <i>Candida dubliniensis</i>	18
3.2.3.1 Susceptibilidad y resistencia a Azoles en <i>C. dubliniensis</i>	19
3.2.3.2 <i>Candida dubliniensis</i> en pacientes pediátricos.....	20
3.3 Tipificación de Levaduras.....	21
3.3.1 Obtención de Cultivos.....	21
3.3.2 Diferenciación en medio cromogénico.....	22
3.3.3 Métodos de diferenciación de <i>Candida albicans</i> y <i>dubliniensis</i>	23
3.3.3.1 Métodos Fenotípicos.....	23
3.3.3.2 Otras pruebas.....	27
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
5.- JUSTIFICACIÓN.....	30
6.-HIPÓTESIS.....	31
7.-OBJETIVOS.....	32
8.-METODOLOGÍA.....	33
9.-RESULTADOS.....	48
10.-ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	74
11.- CONCLUSIONES.....	79
12.- BIBLIOGRAFÍA.....	80
12.-ANEXO.....	91

1.-RESUMEN.

Antecedentes.

En los últimos años se ha descubierto una especie del género *Candida*, *Candida dubliniensis* esta especie se descubrió inicialmente en pacientes inmunosuprimidos y comparte características fenotípicas con *Candida albicans* debido a su cercanía genética. Sin embargo también tienen diferencias, se ha demostrado que algunas cepas de *C. dubliniensis* presentan resistencia a la 5 fluorocitosina y algunas otras cepas se han encontrado en pacientes sin problemas de inmunosupresión provocando fungemias. Estos factores hacen que la diferenciación entre estas dos especies adquiera importancia dentro de los laboratorios clínicos.

Objetivos.

Identificar y diferenciar cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* por medio de pruebas que dejen en evidencia características fenotípicas de cada especie, en aislamientos obtenidos en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría.

Metodología.

Se incluyeron un total de 90 cepas para realizar este estudio. Estas provenían de diversos aislamientos de material biológico entre los que se encontraban: aspirados nasofaríngeos, orina, secreciones bronquiales, aspirado bronquial, sangre, cavidad bucal, escamas de piel y absceso hepático entre otras. Además de dos cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (66027 y 90028) y una de *Candida dubliniensis* (MYA 646). Todas fueron recuperadas mediante subcultivos de veinticuatro horas en agar dextrosa Sabouraud previo a la realización de los ensayos. Las pruebas realizadas fueron, la prueba de termotolerancia a 45° C, observar la morfología colonial y la formación de clamidoconidios en agar Staib y en agar de Pal.

Resultados.

Para las pruebas en agar Staib y agar de Pal las características coloniales así como las microscópicas en la cepa ATCC de *Candida dubliniensis* correspondieron con lo reportado presentándose formación de pseudohifas alrededor de las colonias y formación de clamidoconidios que se observaron microscópicamente. Mientras que las cepas ATCC de *Candida albicans* no presentaban halo de pseudohifas, microscópicamente se observaron abundantes blastoconidios y formación de pseudohifas con ausencia de clamidoconidios donde el cubreobjetos se colocó 48 horas previas. En la prueba de crecimiento a 45° C la cepa de *Candida dubliniensis* no presentó crecimiento mientras que las cepas de *Candida albicans* fueron capaces de desarrollarse a dicha temperatura.

De los 90 aislados de pacientes que fueron probados 5 cepas no presentaron crecimiento a 45° C y solo tres de los aislamientos presentaron halo de pseudofilamentos en agar Staib y de Pal, sin embargo, no presentaron clamidoconidios. Al realizar la identificación de estas cepas por medio del sistema API ID32 se determinó que estas 3 cepas en realidad eran *Candida albicans*.

Conclusiones.

Las pruebas que se seleccionaron para la identificación entre las dos especies diferenciaron adecuadamente a las mismas las colonias presentaron las características propias reportadas.

Ninguno de los aislados de pacientes se identificó como *Candida dubliniensis*, es importante correlacionar las pruebas realizadas para identificar adecuadamente a esta especie ya que al tratarse de pruebas fenotípicas pueden presentarse variaciones debido a las condiciones de la prueba (como lo observado al colocar el cubreobjetos antes y después de la incubación), a las condiciones de estrés de la levadura (tratamiento previo con agentes antifúngicos) y también se ha reportado que la resiembra frecuente de estas cepas puede alterar algunas de estas características.

Estos métodos pueden ser usados en laboratorios que no tengan la capacidad económica de hacer pruebas de biología molecular siempre tomando en cuenta los factores antes mencionados.

2.-INTRODUCCIÓN

La candidosis es una micosis ocasionada por levaduras del género *Candida*. Las manifestaciones clínicas pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; afectan piel, mucosas u órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o reacciones granulomatosas. *Candida albicans* es el agente más frecuente en la candidosis orofaríngea en pacientes inmunosuprimidos, sin embargo en los últimos años su prevalencia ha disminuido; ocasionado por la aparición de especies emergentes de levaduras, como es el caso de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y en los últimos años ha surgido una nueva especie genéticamente similar a *C. albicans*, *C. dubliniensis*. *Candida dubliniensis* es una especie recientemente descrita. La gran mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* identificados hasta la fecha han sido recuperados de la cavidad oral de individuos infectados por VIH, particularmente de aquellos que sufren de episodios de candidosis oral recurrente. Sin embargo existen reportes de aislamientos asociados a vagina y pulmón.

Para tener un conocimiento más completo del rol epidemiológico que esta especie juega en las infecciones humanas, es necesario que haya disponibles pruebas rápidas y confiables para la identificación de *Candida dubliniensis* en el laboratorio clínico de micología de una manera rutinaria. Sin embargo, la introducción de dichas pruebas es complicado por el hecho de que *Candida dubliniensis* comparte muchas características fenotípicas con *Candida albicans*. El alto grado de similitudes entre estas dos especies ha contribuido a errores en la identificación de algunos aislamientos de *Candida dubliniensis* como *Candida albicans*. Las pruebas que se usan actualmente para diferenciar entre las dos especies, están basadas en técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en gel de campo-pulsante y otras. Aunque estas técnicas tienen alta sensibilidad y son efectivas, no son viables en la identificación de números grandes de muestras, como es el caso de un laboratorio de rutina, o no se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios estándar de micología. Mientras el uso de un número de características fenotípicas, por

ejemplo: producción de clamidoconidios, asimilación de carbohidratos, coloración de las colonias en medios cromogénicos (CHROMagar), han sido investigados, ninguno ha probado ser un método confiable para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Se probaron tres de esos métodos con la finalidad de establecer cual o cuales podrían ser utilizados dentro del laboratorio de una manera rutinaria y económica para discernir entre estas dos especies.

3.-ANTECEDENTES

3.1 Candidosis.

La candidosis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras del genero *Candida sp.* Las manifestaciones pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas u órganos internos. *Candida albicans* es el responsable de alrededor del 50 % de infecciones provocadas por este género, sin embargo en los últimos años ha surgido una nueva especie *Candida dubliniensis* con características muy similares a las de *Candida albicans*.¹

Estas similitudes hacen que la diferenciación entre las dos especies por medio de pruebas de rutina sea muy difícil y se recurra a técnicas de biología molecular para su identificación. *Candida dubliniensis* es cosmopolita y fue descrita como una especie nueva en 1995. Estudios retrospectivos han mostrado que especies de *Candida dubliniensis* fueron identificadas como *Candida albicans* en estos estudios las cepas de *Candida dubliniensis* se aislaron de pacientes inmunocomprometidos. Es importante diferenciar entre estas cepas ya que su comportamiento patológico así como la terapéutica para las dos cepas es diferente a pesar de que sus características fenotípicas sean muy semejantes.^{1,2,3}

3.1.1 Epidemiología.

La candidosis es una enfermedad cosmopolita y una de las micosis que se presenta con mayor frecuencia en el mundo. Se puede encontrar a diversas especies del género *Candida* habitando en el humano así como en algunos animales. Se han reportado aislamientos de diversas levaduras en instrumental de hospitales así como áreas de los mismos además de un caso donde se reporta la presencia de *Candida dubliniensis* en aves marinas en Irlanda.^{4,5,6,8}

Diversas especies del género *Candida* se encuentran como componentes de la microbiota habitual del cuerpo, se encuentran presentes desde los primeros días del nacimiento presentando una gran predilección por las mucosas. Se pueden

encontrar en un gran número de sitios anatómicos como el tracto gastrointestinal, la laringe, la faringe así como la cavidad oral, el número puede verse afectado por factores como la falta de aseo así como una baja en las defensas del huésped.^{8,9,10}

Debido a que *Candida albicans* y otras especies oportunistas son parte de la microbiota habitual, en general van a provocar enfermedades endógenas favorecidas por algún factor predisponente. Entre los más frecuentes podemos encontrar:

-Factores fisiológicos: Como cambios de pH especialmente en vagina y boca, embarazo y prematuridad.^{10,11,12}

-Enfermedades o procesos debilitantes: diabetes, tuberculosis y desnutrición.¹²

-Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, pacientes VIH positivos, SIDA estos dos últimos factores favorecen la colonización por *Candida dubliniensis*^{1,3,9}

-Iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos; dispositivos intrauterinos y tratamientos con anticonceptivos orales aunque aun no hay un consenso respecto a este último. Cateterismo y procesos quirúrgicos invasivos^{14,15,16,17,18}

-Misceláneos: dermatosis inflamatorias previas (dermatitis por contacto y del área del pañal, mal estado de la dentadura, prótesis mal adaptadas y humedad).^{19,20,21,22}

3.1.2 Patogenia.

Al ser considerada como una enfermedad oportunista, la Candidosis requiere forzosamente de factores predisponentes, en la mayoría de las ocasiones se

origina de manera endógena, atribuible casi siempre a dos procesos: el desequilibrio de la microbiota, que favorece el incremento de levaduras , y que puede ser ocasionado por cambios en el pH, acumulación de nutrientes como el glucógeno, o por la disminución de microbiota bacteriana por antibióticos; el segundo proceso que puede favorecer el desarrollo de una Candidosis son enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, entre estos tenemos defectos en leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B.^{1,3,9,13,23,24}

En los casos exógenos de candidosis el inicio de la enfermedad ocurre por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, ejemplos de esto son las personas que usan drogas inyectables y dentro de los hospitales, el caso más común cateterismo debido a que se está inoculando los microorganismos de manera directa en el torrente sanguíneo.^{14,15}

3.1.3 Aspectos Clínicos.

La candidosis es una de las infecciones más polimórficas, su nivel de profundidad o sistematización no depende tanto del agente si no del factor predisponente que se asocie.

Candidosis	Forma clínica
Alérgica	Eccema Rinitis, alveolitis y asma Gastritis alérgica
Cutánea	Intertrigos Onicomicosis Pustulosis Granulomatosa

Miscelánea	Otitis Ulceras corneales Endoftalmitis
Mucocutánea	Oral Genital Mucocutánea crónica Gastrointestinal Bronquial / pulmonar
Sistémica	Tracto urinario Meningitis Endocarditis Candidemia (fungemia)

Tabla 1 Formas clínicas de la Candidosis.

3.2 Candida.

3.2.1 Clasificación Taxonómica.

Reino Fungi

Clase Deuteromycetes

Subclase Blastomycetidae

Orden Criptococal

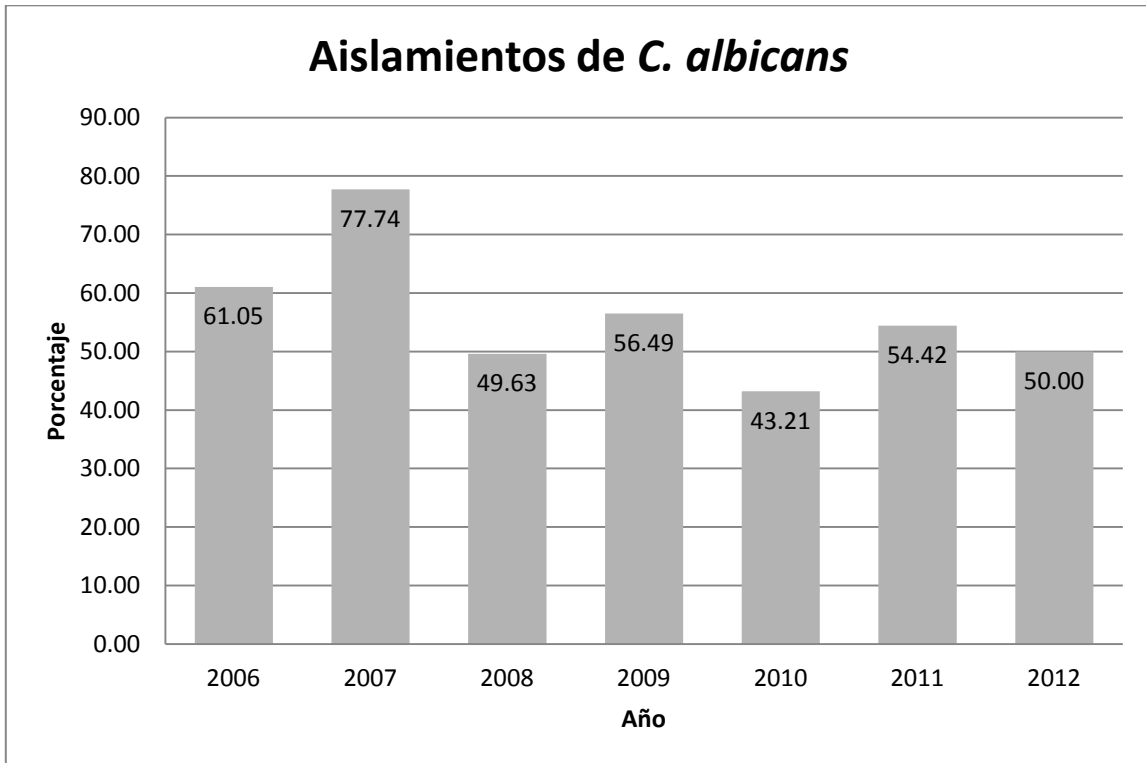
Familia Criptocaceae

Género Candida

Especie albicans y dubliniensis

3.2.2 *Candida albicans*.

Entre las especies de *Candida*, *Candida albicans* es la especie que se aísla más comúnmente de pacientes en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría se ha observado que esta especie es el responsable de alrededor de 50% de las infecciones provocadas por levaduras. Del año 2006 al 2012 se ha observado una disminución de la frecuencia de este agente dando paso a otras especies.



Gráfica 1 Porcentaje de aislamientos clasificados como *C. albicans* de 2006 al 2012 dentro del Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

En la mayoría de los individuos *Candida albicans* se encuentra como un comensal no dañino vitalicio. Pero bajo ciertas condiciones *C. albicans* puede causar infecciones que varían desde infecciones superficiales a la piel hasta infecciones sistémicas que pongan en peligro la vida de los pacientes. Se han identificado muchos factores y actividades que le otorgan su patogenicidad a este organismo.

3.2.2.1 Factores de patogenicidad.

La habilidad que tiene *Candida albicans* para infectar huéspedes tan diversos está dada por una gran cantidad de factores de virulencia, muchos de estos factores también se encuentran presentes en *Candida dubliniensis* por su cercanía genética. Estos atributos incluyen la transición morfológica (levaduriforme, pseudohifas e hifas verdaderas), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la formación de biofilms, el cambio fenotípico y la secreción de hidrolasas son considerados factores de patogenicidad.²⁵

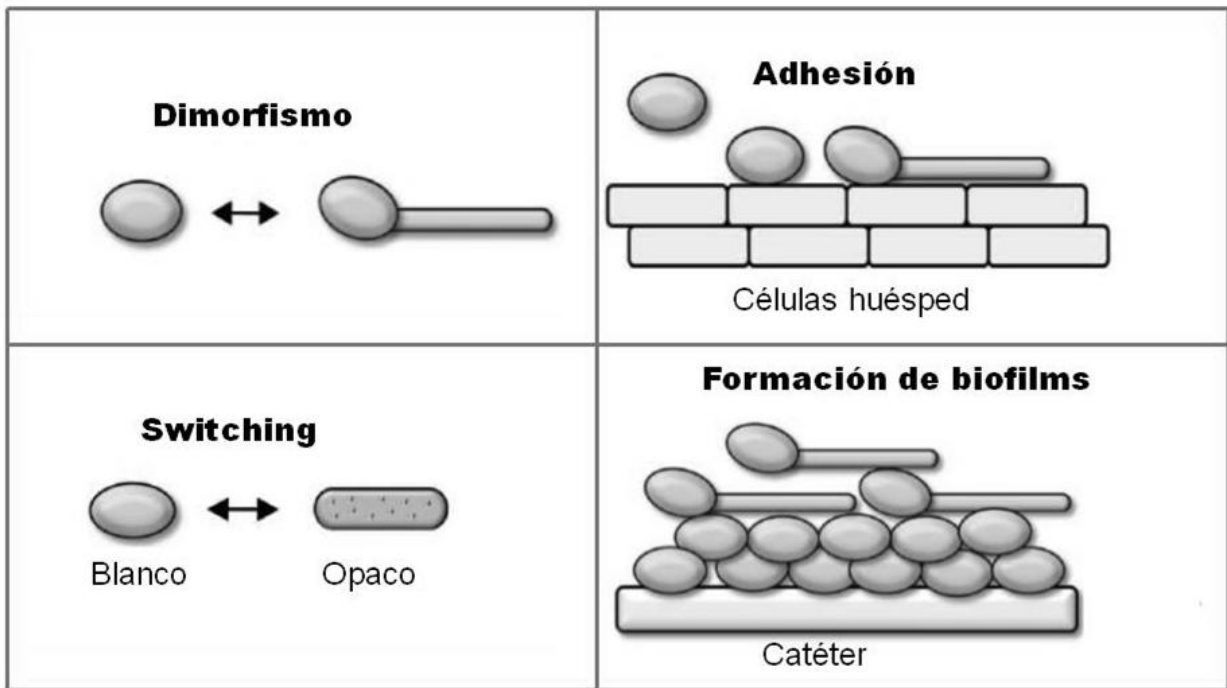


Figura 1 Factores de patogenicidad presentados por *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

3.2.2.1.1 Polimorfismo.

Candida albicans es un hongo polimórfico que puede crecer ya sea como un levadura con blastoconidios ovoides, como células elongadas elipsoides con constricciones en los septos (pseudohifas) o como hifas verdaderas de paredes paralelas. Otras morfologías incluyen células blancas y opacas formadas durante

el switching fenotípico y los clamidoconidios que son estructuras de paredes gruesas semejantes a las esporas. A pesar de que la habilidad para cambiar de blastoconidios a pseudohifas e hifas se le atribuye un rol implicado en la virulencia no hay una prueba consistente que lo demuestre.^{25,26,27}

Tanto los pseudofilamentos como los filamentos son considerados invasivos ya que en el agar puede observarse como estas estructuras penetran en el medio este comportamiento ha llevado a la creencia de que este tipo de estructuras pueden facilitar la penetración del microorganismo a los tejidos en etapas tempranas de la infección mientras que la forma de blastoconidios está más relacionada con la diseminación del microorganismo en la sangre. Las formas filamentosas también pueden ser útiles en la invasión de ciertos órganos como los riñones.^{26,27}

Estudios del switching morfológico han reportado descripciones de los diferentes estados morfológicos así como de los diferentes factores que produjeron estos cambios. El switching morfológico de levaduras a formas filamentosas puede ser inducido por una gran variedad de condiciones ambientales.^{26,27,28}

La formación de hifas puede ser inducida por la prueba de generación de tubo germinal en suero humano a 37 °C. Un cultivo a una temperatura sobre los 35 °C y a pH neutro también induce la formación de pseudohifas e hifas con pequeños cambios sobre estas condiciones determinando cual será el resultado final. Recientemente también se ha reportado que a altas concentraciones de fosfato (arriba de 600mM) se induce la formación uniforme de pseudohifas. La formación de pseudohifas también se relaciona a la falta de nutrientes en el medio.^{26,27,28}

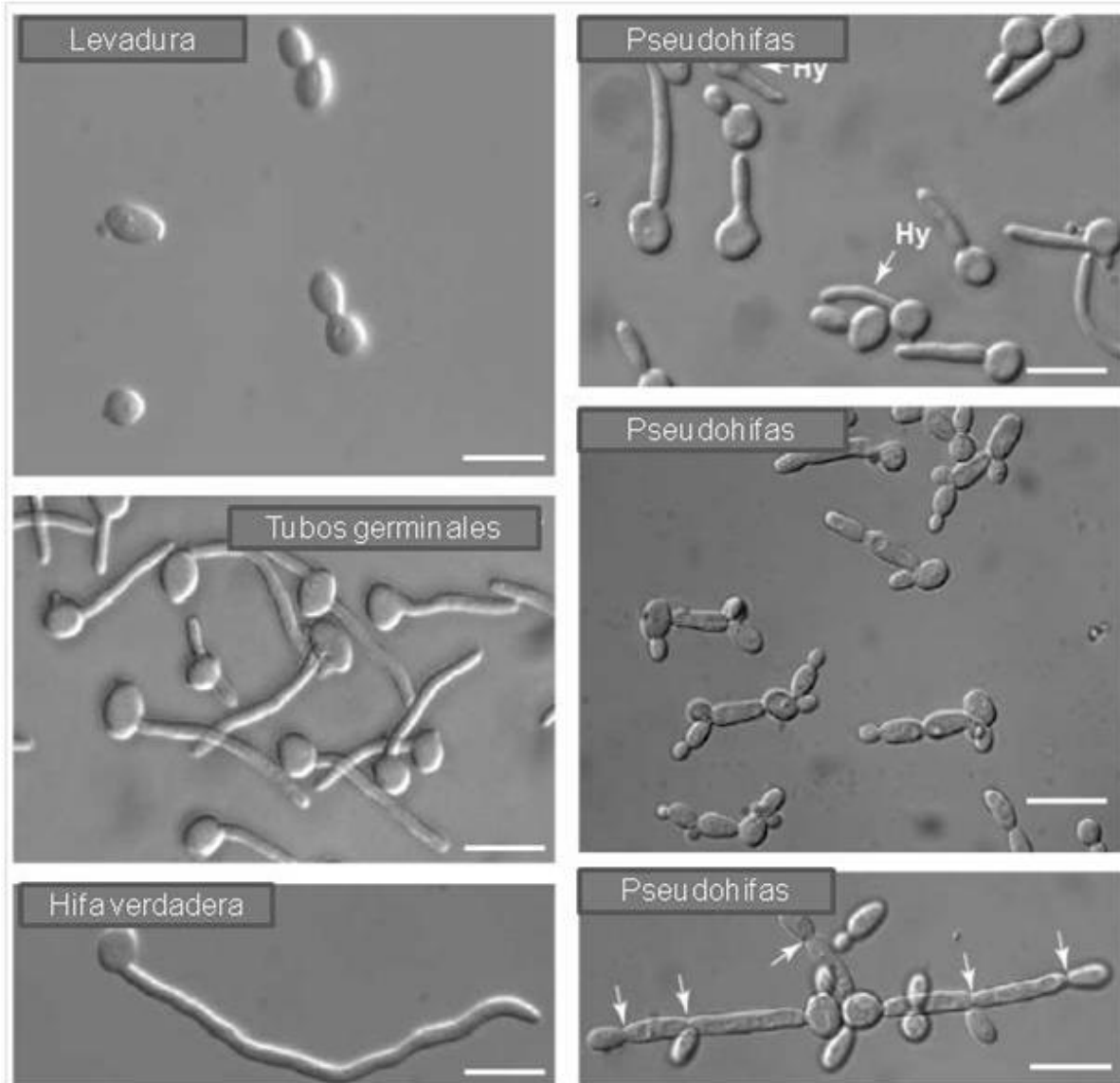


Figura 2. Las diversas morfologías, levadura, pseudohifas e hifas.

3.2.2.1.2 Adhesinas e Invasinas.

Candida albicans ha desarrollado una serie de proteínas especializadas en la adhesión de la misma a otras células de *Candida albicans*, a otros microorganismos, a superficies abióticas y células huésped. Las adhesinas más estudiadas son las adhesinas de secuencia tipo aglutinina (ALS por sus siglas en inglés), que son proteínas que forman una familia consistente de ocho miembros.

De las ocho proteínas Als, las adhesinas asociadas a hifas Als 3 son de especial importancia para la adhesión.^{29, 30, 31, 32.}

Otra adhesina importante es Hwpl, esta sirve como un sustrato para las transglutaminasas de mamíferos y esta reacción puede unir covalentemente las hifas a las células huésped. Se ha demostrado que mutantes *hwpl*Δ/Δ muestran una adherencia reducida a células epiteliales bucales y mostraron virulencia atenuada en un modelo murino de candidiasis sistémica.^{33,34,35.}

Se ha demostrado que Hwpl y Als3 también contribuyen a la formación de biofilms ya que funcionan como adhesinas complementarias.³⁶

3.2.2.1.3 Formación de biofilms.

Otro de los factores de patogenicidad importantes presentes en estas especies es la capacidad de formar biofilms en superficies bióticas como abióticas. Catéteres, dentaduras y mucosas son las superficies más comunes. Los biofilms “maduros” son mucho más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos así como a las acciones de la respuesta inmune del huésped, esto debido a la formación compleja de los biofilms, la matriz de los mismos y la expresión incrementada de bombas que expulsan fármacos dañinos para la célula, entre otros factores.^{37, 38}

La formación de biofilms está controlada por diversos factores de transcripción (*BCR1*, *TEC1*, *EFG1*, *NDT80*, *ROB1* o *BRG1*) la delección de alguno de estos factores resulta en la formación defectuosa de biofilm en modelos in vivo de infección en rata.^{29, 39}

La formación de la matriz extracelular está controlada por factores adicionales. Esta matriz es de importancia ya que estudios recientes indican que otorga resistencia al ataque y muerte por neutrófilos además de que evita la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).⁴⁰

3.2.3 *Candida dubliniensis*.

Identificada como una nueva especie por primera vez en 1995 por J. Sullivan. El aislamiento se realizó en Irlanda, Dublín, motivo por el cual se nombró a la nueva especie “dubliniensis” el aislamiento provenía de un paciente VIH positivo con una candidosis orofaríngea. Desde los comienzos de la década de los 90 se estudió la aparición de una nueva especie que era capaz de formar tubo germinal en suero y formar clamidoconidios en medio Corn meal pero que en la prueba de hibridación con la prueba “fingerprint 27 A” de *Candida albicans* era negativa, esta prueba consistió en usar DNA genómico de diversos aislados que fue previamente digerido con EcoRI y sondeado con la sonda de huella dactilar de DNA repetitivo *C. albicans*-específico 27 A pero las bandas obtenidas eran menores y más débiles que las que se obtenían al realizar la prueba con una cepa de *C. albicans*. Después de 5 años de estudio se denominó a esta nueva especie como *C. dubliniensis*.^{1,3,9,10}

A pesar de que ambas especies (*C. albicans* y *C. dubliniensis*) comparten muchas similitudes, hay características propias que les otorgan diferente comportamiento patogénico. Estudios posteriormente revelaron que *C. dubliniensis* parecía poseer una menor patogenicidad comparada con la de *C. albicans*, siendo algunos de sus factores de virulencia más relevantes la producción de hifas, la capacidad de crecer en medios a temperaturas altas (42-45° C) y crecer a una alta concentración de NaCl y H₂O₂.⁴¹⁻⁴⁸

Al contrario de lo que sucede con *C. albicans*, *C. dubliniensis* parece no formar parte de la microbiota habitual de la boca y vagina, en un estudio realizado en una población en Irlanda, se encontró que solo el 3.5% de personas sanas eran portadoras de *C. dubliniensis* en la boca.⁴⁹

Candida dubliniensis aparece normalmente asociada con casos recurrentes orales como gingivitis, pero también se han reportado aislamientos de vagina y pulmón

en pacientes inmunosuprimidos y algunos casos en pacientes pediátricos diabéticos. También fueron reportadas infecciones en pacientes con tratamiento citotóxico para el rabdosarcoma y en algunos pacientes hematológicos con trasplante alogénico.^{12,13,17,21,20,51}

La correcta identificación de esta especie es de vital importancia en el tratamiento de las afecciones que produce, se ha investigado la susceptibilidad de esta nueva especie a los antimicóticos y algunos estudios demuestran que solo algunas cepas de esta especie son resistentes al fluconazol.⁵²

3.2.3.1 Susceptibilidad y resistencia a Azoles en *C. dubliniensis*.

Los Azoles tienen como objetivo la síntesis de ergosterol, el esteroles predominante en la pared celular fúngica, y son actualmente la clase más usada de agentes antifúngicos en el tratamiento de infecciones por el género *Candida*. La gran mayoría de los aislados clínicos de *C. dubliniensis* son susceptibles a los azoles. Mientras que la mayoría de los aislados de *Candida dubliniensis* son susceptibles al fluconazol, un número de aislados muestran susceptibilidad reducida o resistencia. La mayoría de estos aislados fueron recuperados de pacientes infectados de VIH que recibieron terapia con fluconazol.^{52, 53,54}

Moran demostró que los derivados resistentes a fluconazol podían ser producidos a partir de cepas sensibles después de exposición repetida a fluconazol in vitro indicando que *Candida dubliniensis* tiene la habilidad de rápidamente desarrollar resistencia a este fármaco.⁵⁵

También se ha demostrado in vitro que la exposición a fluconazol resulta en un incremento de la adhesión de *C. dubliniensis* a las células epiteliales mientras que la adherencia de *Candida albicans* se ve reducida en las mismas condiciones. Es posible que el tratamiento con fluconazol produzca una ventaja selectiva favoreciendo el crecimiento de *Candida dubliniensis* sobre *Candida albicans*. Lo cual explicaría los altos índices de recuperación de *C. dubliniensis* de pacientes con VIH.^{55,56}

En un estudio realizado por Pinjón se demostró que *Candida dubliniensis* puede reemplazar a *Candida albicans* después de tratamiento con azoles y aunque el tratamiento con azoles prolongado puede ser una de las causas de la selección entre estas dos especies, también hay otros factores que pueden estar implicados ya que al final del estudio realizado la mayoría de los aislados recuperados no mostraron susceptibilidad reducida a los azoles. La resistencia al itraconazol también ha sido descrita en algunos estudios y al igual que con el fluconazol puede ser inducida por exposición in vitro al fármaco.^{52,54,56}

3.2.3.2 Candida dubliniensis en pacientes pediátricos.

Se han reportado varios casos de infecciones de *Candida dubliniensis* en pacientes pediátricos, especialmente en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos. Estos pacientes están comúnmente recibiendo tratamientos de quimioterapia o se encuentran infectados por VIH. Los datos de pacientes adultos inmunocomprometidos en la literatura es de importancia al reconocer a este organismo como a un patógeno de interés, pero como es el caso de otras enfermedades infecciosas en pacientes con VIH, los datos en pacientes pediátricos son muy pocos o son muy distintos. Se tienen reportes hasta ahora en poblaciones de pacientes pediátricos inmunocomprometidos pero consisten en estudios de colonización y no de infección.⁷²⁻⁷⁵

Existen reportes de colonización de cavidad oral así como de tracto respiratorio, pero también se han reportado casos de fungemias, algunas de estas en pacientes inmunocompetentes. El hecho de que *Candida dubliniensis* se encuentre generalmente en pacientes inmunocomprometidos es de importancia ya que aunque posee una menor patogenicidad que la de *Candida albicans*, el régimen que se sigue en estos pacientes puede generar cepas resistentes a algunos azoles, seguido de la selección y recambio de *Candida albicans* por *Candida dubliniensis* en las mucosas. Al detectarse esta especie, lo oportuno sería realizar un cambio en el tratamiento.⁵²⁻⁵⁶

La obtención de datos del comportamiento de *Candida dubliniensis*, en población pediátrica y en especial cuando algunos autores ya reconocen esta especie como patógeno emergente hacen de la identificación y diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* tome gran importancia.⁵⁰

3.3 Tipificación de Levaduras

La tipificación dentro del laboratorio es un proceso o serie de procesos por medio de los cuales se asigna el género y la especie a un microorganismo con el fin de identificarlo e identificar así mismo la mejor terapia para el paciente.

Para la tipificación de las diversas especies de levaduras dentro del laboratorio se lleva a cabo la siguiente secuencia de pruebas de laboratorio.

3.3.1 Obtención de Cultivos

Todas las muestras provenientes de pacientes se siembran en agar dextrosa Sabouraud, Sabouraud adicionado con cloranfenicol y Mycosel esto también depende del origen de la muestra, en estos tubos se realizará el primoaislamiento. Los tubos se colocan a incubación a 28° C y se revisan periódicamente para observar cualquier crecimiento en los mismos. Las colonias generalmente se desarrollan en un promedio de 48 a 72 horas posteriores a la siembra en caso de hongos levaduriformes, mientras algunos hongos miceliales pueden tardar un periodo de tiempo similar o superior.

A todas las colonias que se aprecian en el medio de cultivo se les realiza un examen directo con la finalidad de determinar de qué tipo de microorganismo se trata. Este examen directo se realiza colocando un gota de azul de lactofenol en el portaobjetos y en el caso de todas aquellas colonias de crecimiento levaduriforme se procede a tomar una porción de la colonia, disolverla en el azul de lactofenol y tapar con un cubreobjetos. En el caso de las colonias de crecimiento micelial se procede a colocar un trozo de cinta adhesiva en un asa micológica previamente esterilizada a la llama, se toca la colonia de interés y a continuación se coloca la

cinta sobre la gota de azul de lactofenol para posteriormente cubrir la cinta con un cubreobjetos. Se observa al microscopio las preparaciones. Es importante acotar que en la elaboración de este trabajo los organismos de interés fueron todos aquellos que se identificaron como colonias de levaduras.

Aquellas colonias en donde se observen blastoconidios son resembradas en medio cromogénico CHROMAgar®

3.3.2 Diferenciación en medio cromogénico

Este paso de la tipificación es importante ya que se separan las especies de *Candida albicans* (*dublinskiensis* también se separa en esta fase debido al color verde característico que presentan las colonias) de las especies no albicans. Las colonias levaduriformes confirmadas por el examen directo obtenidas a partir de los cultivos de los materiales biológicos, se siembran en el medio cromogénico (CHROMAgar®) por agotamiento y se colocan a incubación a 37° C durante 48 horas. Las colonias de color verde claro o verde se clasifican como *Candida albicans*, mientras que las colonias azules se clasifican como *Candida tropicalis* y las colonias rosa a rosa claro como *Candida krusei*.

Además de el CHROMAgar® existen comercialmente otros medios que tienen un funcionamiento similar aunque las coloraciones pueden diferir.

Dentro del laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de pediatría se separa en esta etapa con el uso del CHROMAgar® alrededor del 50% del total de las levaduras que se reciben en el laboratorio y se prosigue a realizar pruebas bioquímicas para determinar la especie de la levadura.

Otras de las pruebas que se utilizan para la diferenciación de *Candida albicans* (y *C. dublinskiensis*) son la formación de clamidoconidios en Cornmeal y la formación de tubo germinativo en suero humano, sin embargo estos dos métodos no permiten la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dublinskiensis*. Para la

diferenciación entre estas dos especies se utilizan algunos de los métodos que se mencionan a continuación.

3.3.3 Métodos de diferenciación de *Candida albicans* y *dublinskiensis*.

Como se mencionó anteriormente *Candida albicans* y *Candida dublinskiensis* son dos especies que tienen características fenotípicas casi idénticas lo que dificulta su diferenciación en laboratorios clínicos y hospitales. Algunas de las características que comparten son la formación de pseudohifas, prueba de tubo germinativo (en suero humano en 3 horas a 37°C) y la producción de clamidoconidios en Agar harina de maíz (Corn meal) cabe destacar que en esta última se reporta que *Candida albicans* produce clamidoconidios únicos y terminales mientras que *Candida dublinskiensis* produce clamidoconidios múltiples y en racimo.

Por tales motivos se ha recurrido al desarrollo de pruebas que pongan en evidencia las características fenotípicas particulares de cada especie.

3.3.3.1 Métodos Fenotípicos.

Para la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dublinskiensis* se ha recurrido a la expresión de ciertas características fenotípicas propias de cada especie.

3.3.3.1.1 Medios Cromogénicos.

Algunos autores mencionan los medios cromogénicos, como el CHROMAgar *Candida*®, que se basa en la actividad de la enzima hexosaminidasa, como medio de diferenciación entre estas dos especies en este medio transcurridas las 48 hrs de incubación a 37 °C, *Candida albicans* presenta colonias de color verde claro mientras que *Candida dublinskiensis* presenta colonias verdes oscuras. Sin embargo

en el laboratorio la experiencia ha demostrado que cepas de *Candida albicans* pueden llegar a presentar una coloración verde oscura.^{41,43,44}

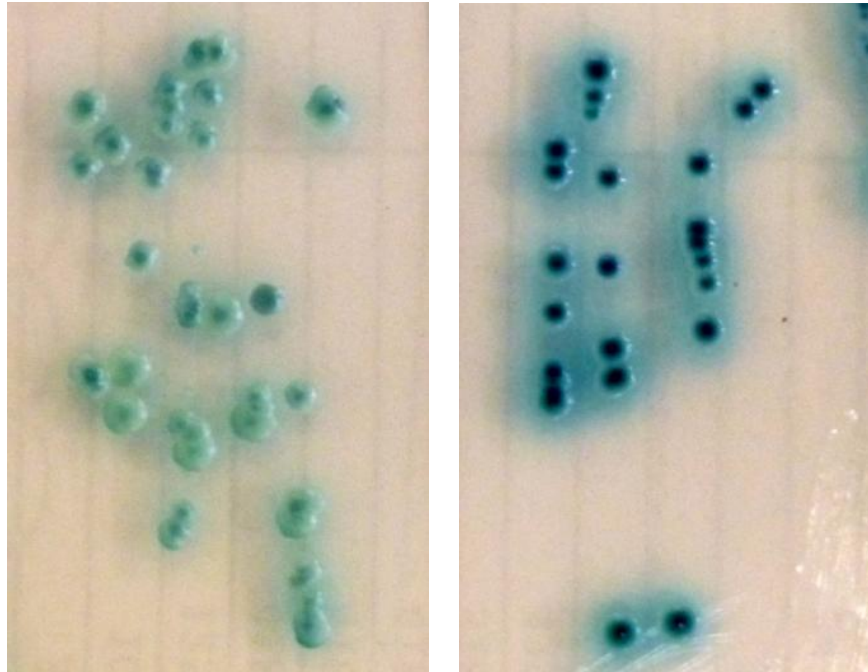


Figura 3. Medio cromogénico CHROMAgar Cepas *Candida albicans* (izquierda) y *Candida dubliniensis* CD36 (derecha)

3.3.3.1.2 Producción de Clamidoconidios.

La producción de clamidoconidios es una prueba que se utilizaba para la diferenciación de *Candida albicans* de las demás especies, al ser tan similares *Candida dubliniensis* también posee esta cualidad. En los últimos años se han encontrado medios en los cuales *C. dubliniensis* es capaz de producir clamidoconidios mientras que en *C. albicans* no se presentan o se presentan en muy poca cantidad. En la mayoría de los casos los medios son escasos en nutrientes y tienen un pH ácido, entre estos medios podemos mencionar el agar Staib, el agar de semilla de girasol, el agar tabaco y agar caseína entre algunos. En el caso del agar de semilla de girasol también conocido como agar de Pal se considera la morfología colonial característica para diferenciar entre las dos especies presentándose *C. albicans* como colonias lisas, mientras que en el caso

de *C. dubliniensis* se aprecian colonias rugosas rodeadas de un halo de pseudohifas.^{41,42,44,45,48,49}

Se han realizado algunas pruebas para determinar las causas del por qué *Candida dubliniensis* es capaz de desarrollar clamidoconidios mientras que *Candida albicans* no, siendo que ambas especies son capaces de producirlas en otros medios como Corn meal adicionado con Tween 80. Se analizó el perfil transcripcional de ambas especies mediante secuenciación de RNA mientras crecían en agar Staib liquido, también se incluyó dentro de este estudio una cepa mutante de *Candida albicans* la cual carece del represor transcripcional morfogenético Ngr1. Esta cepa se caracteriza por su crecimiento como pseudofilamentos así como la producción de cúmulos de clamidoconidios en medio Staib similar al crecimiento de *Candida dubliniensis*. Este estudio permitió entender la importancia que tiene la regulación genética en la expresión de pseudohifas y de clamidoconidios en estas dos especies.^{45,46}

Aunque el agar tabaco es una alternativa económica ya que no requiere de aditivos como el Tween 80, es fácil de preparar, permanece viable hasta por 4 semanas y no se contamina tan fácilmente por bacterias tiene la desventaja de que no proporciona un medio para diferenciar entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.⁶⁴

3.3.3.1.3 Crecimiento en medio Xilosa

La D- xilosa es uno de los carbohidratos presentes en el sistema de identificación API 20C AUX yeast. La asimilación de la xilosa ha sido reportada como una prueba reproducible y confiable para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. También la asimilación de la α -metil-D-glucosido (α -MDG) ha sido de utilidad para la diferenciación entre estas dos especies.^{58,59}

Estos descubrimientos se basan en el uso de las galerías API 20C AUX que fueron incubadas durante 72 horas a una temperatura de 30 °C como se recomienda por el fabricante. Razón por la cual posteriormente se realizó un estudio donde se analizó la posibilidad de reducir los tiempos de incubación obteniendo buenos resultados donde 29 de los 30 aislados de *C. albicans* eran capaces de presentar turbidez indicando crecimiento a las 16 horas mientras que ninguno de los aislados de *C. dubliniensis* presentaba turbidez/ crecimiento.^{50,61,62}

3.3.3.1.4 Crecimiento altas temperaturas.

Esta prueba se realiza en agar papa dextrosa a 42 °C durante 48 hrs de incubación, los aislados de *C. albicans* crecen a esta temperatura mientras que los aislados de *C. dubliniensis* presentan crecimiento escaso o nulo, debido a que a esta temperatura se han reportado casos en los que las cepas de *Candida dubliniensis* continua creciendo se opto por experimentar con otra temperatura eligiendo los 45°C para este fin. Al realizar la prueba a 45° C las cepas que habían presentado crecimiento a 42° C fueron incapaces de desarrollarse por lo que esta nueva temperatura permitió separar con mejores resultados ambas especies. Esta prueba también se ha realizado en agar Sabouraud de Emmons.^{41,44,56}

3.3.3.1.5 Crecimiento en medio hipertónico.

Alves reporto en el 2002 que se podía utilizar caldo Sabouraud adicionado con 6.5% de NaCl como un método simple y accesible para la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. De las 84 cepas de *Candida albicans* que probaron en este medio todas mostraron crecimiento significativo, mientras que todos los aislados de *Candida dubliniensis* que se emplearon no presentaron ningún desarrollo visualmente detectable. Estos descubrimientos fueron corroborados posteriormente.^{64,65}

También se han realizado estas pruebas en agar Sabouraud con 6.5% de NaCl debido a que se consideró que la observación del crecimiento está dada por la

capacidad del analista de observar turbidez lo que puede llevar a errores de interpretación por parte del mismo. Al hacerse en medio sólido se elimina el factor de error que pudiera dar un falso positivo o falsos negativos.^{64,65}

3.3.3.1.5 CHORMAgar y Agar de Pal

También se ha experimentado con combinaciones de dos métodos donde se elabora un medio que contiene CHROMAgar Candida® y agar de Pal en una relación 1:1 obteniendo buenos resultados en la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. *C. albicans* desarrolla colonias verdes claras y lisas mientras que en el caso de *C. dubliniensis* son colonias verdes oscuras con un halo de pseudohifas. En este medio también se ha podido diferenciar con éxito colonias de *Candida krusei* que se presentan como colonias con halos de pseudofilamentos de color rosa.⁴⁸

3.3.3.2 Otras pruebas

Debido a las variaciones que se presentan en las pruebas fenotípicas también se han desarrollado pruebas de mayor especificidad y sensibilidad como patrones electroforéticos de DNA, análisis de enzimas de restricción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3.3.2.1 Ensayos de inmunofluorescencia.

Se realizó un estudio en 1998, en el cual fue preparado un antisuero policlonal en ratones neozelandeses, para posteriormente probarlo en la identificación de varias levaduras. Se realizaron varias pruebas de inmunofluorescencia indirecta, donde se adicionó anti-*C. dubliniensis* a aislamientos de varias levaduras para luego agregar el conjugado de anti-anticuerpos de ratón marcado con el fluorocromo.⁶³ Conforme avanzó el estudio se trató de purificar el antisuero y eliminar todos aquellos anticuerpos que reconocieran a los antígenos comunes entre los

blastoconidios de *C. dubliniensis* y de *C. albicans*. Se logró obtener un antisuero capaz de no presentar una reacción cruzada con *C. albicans* y que reconociera específicamente a *C. dubliniensis*, sin embargo, este siguió presentando en algunos experimentos reacciones cruzadas con *C. kusei* y con *Rhodotorula rubra*.⁶³

3.3.3.2.1 Métodos moleculares.

Los métodos moleculares se basan generalmente en el análisis de las regiones genómicas de ADN ribosómico D1/D2 de la subunidad 26S, ITS1,ITS2, y 5.8S y son muy confiables para la diferenciación e identificación de especies sin embargo son muy caros y complejos para su implementación en el laboratorio clínico de rutina.⁶⁶⁻⁶⁹

3.3.3.2.2 MALDI-TOF

La espectrometría de masas constituye un nuevo método para la identificación de microorganismos disponible desde hace más de 30 años, pero fue solo a partir de 2008 que se ha venido utilizando para este fin en el laboratorio clínico por su rapidez, precisión y su relativo bajo costo comparado con otros métodos. Actualmente se utiliza el método denominado *matrix assisted laser desorption ionization time of flight* (MALDI-TOF) disponible en el sistema Vitek.^{70,71}

Este examina los patrones de proteínas detectadas directamente del microorganismo intacto. La muestra a ser analizada es una mezcla de otros componentes llamada matriz. La mezcla es aplicada a un plato de metal e irradiada con un láser. La matriz absorbe la luz láser y vaporiza, en el proceso de ganancia de cargas (ionización). Los campos eléctricos luego guían los iones al mismo, lo que los separa de acuerdo a su carga de masa y finalmente la cantidad de cada ion es determinada. Esto se puede comparar con una biblioteca para determinar la identidad del microorganismo estudiado.^{70,71}

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde su descubrimiento en 1995 por Sullivan ha sido evidente que *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* comparten un gran número de características que dificulta su diferenciación. A raíz de esto se ha recurrido al uso de técnicas de biología molecular, sin embargo no todos los laboratorios cuentan con los recursos para realizarlas por lo que en los últimos años se han desarrollado pruebas que ponen en evidencia características específicas de cada especie por lo que es de importancia saber cuál o cuáles de estas pruebas en conjunto nos ayuda a identificar adecuadamente estas dos especies ya que a pesar de que tienen muchas similitudes también tienen diferencias en cuanto a su patogenicidad.

5.- JUSTIFICACIÓN.

Desde su descubrimiento *Candida dubliniensis* ha presentado un reto para su identificación y diferenciación de *Candida albicans*, debido a las características que antes se creían únicas en *C. albicans* ahora se sabe también posee *C. dubliniensis*. Por esta razón fue necesario desarrollar nuevas técnicas y pruebas para la diferenciación de estas, aunque algunas de estas técnicas requieren de equipos con altos costos a los que no puede tener acceso muchos laboratorios de rutina con las pruebas que ponen en evidencia las características propias fenotípicas se ha abierto nuevas posibilidades.

6.-HIPÓTESIS.

Del total de las cepas identificadas previamente como *Candida albicans* de los materiales biológicos obtenidos de los pacientes del Instituto Nacional de Pediatría algunas se trataran en realidad de cepas de *C. dubliniensis* las cuales se identificaran por los métodos fenotípicos empleados.

7.-OBJETIVOS

Objetivos Generales

Identificar cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* por medio de pruebas que dejen en evidencia características fenotípicas de cada especie, en aislamientos obtenidos en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría.

Objetivos Particulares.

- Determinar la frecuencia de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en pacientes pediátricos.
- Correlacionar los aislamientos de ambas especies con las formas clínicas de la Candidosis.

8.-METODOLOGÍA.

Se realizó un estudio para determinar la utilidad de las características fenotípicas de *Candida dubliniensis* en su tipificación y diferenciación de *Candida albicans*, se utilizaron 90 aislados de pacientes obtenidos en el Instituto Nacional de Pediatría. El aislamiento de las cepas utilizadas para el experimento se llevo a cabo durante seis meses.

Pacientes.

Criterios de inclusión.

Se incluyeron todas las cepas provenientes de pacientes del INP que fueron identificadas como *Candida albicans*.

Criterios de no inclusión.

No hubieron criterios de no inclusión

Registro.

Los datos obtenidos de cada uno de los pacientes fueron registrados en un formato, donde se incluyó: género, edad, diagnostico, registro, cama, muestra y número micológico. Esta información se incluyen en el anexo de este trabajo.

Recepción de muestras.

Laboratorio de parasitología y micología.

Al laboratorio de micología llegan muestras de diferentes orígenes como: Orina, Heces, Sangre, Aspirados faríngeos, Lavados bronquiales, Líquidos cefalorraquídeos

Orina.

Las muestras de orina que llegan al laboratorio se reciben en bolsas de colecta o en su defecto en recipientes de plástico o de vidrio estériles. Es muy importante

homogenizar la orina antes de realizar el proceso que se describe a continuación. En ambiente de esterilidad se realiza un orificio al costado de la bolsa usando un asa micológica previamente calentada. A continuación se introduce un asa calibrada desechable de 10 µL dentro de la bolsa para hacer la toma de muestra, el asa calibrada se gira suavemente para homogenizar la orina, con el asa calibrada se siembra una caja de agar Sabouraud con cloranfenicol en la cual se realizara el conteo de UFC y se quema el asa para desecharla. Posteriormente se utiliza una pipeta Pasteur para tomar muestra y colocar un volumen suficiente de orina para cubrir la superficie de un tubo con agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol. El resto de la orina se colecta en un tubo cónico estéril y se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos, transcurridos los 15 minutos se realiza un examen directo usando el precipitado obtenido.

Heces.

Para procesar las heces se hacen dos exámenes directos uno con KOH y el otro con Lugol, el primero nos ayuda a identificar estructuras fúngicas y el segundo a verificar la presencia de parásitos en la muestra. Los exámenes se realizan aplicando una gota de los reactivos en un portaobjetos y con la ayuda de un aplicador de madera se coloca la muestra sobre el reactivo y se homogeniza. A continuación se inocular la muestra en tubos de ensaye de 16x150 mm con Sabouraud y Sabouraud adicionado con cloranfenicol.

FRU (fragmentos y residuos de uñas).

Esta muestra se toma generalmente en el laboratorio. Se utilizan 2 portaobjetos estériles y una cucharilla para la toma de muestra. La toma se realiza raspando la uña afectada con ayuda de la cucharilla y colocando los fragmentos de uña sobre los portaobjetos. Para procesar las muestra se reúnen los fragmentos de uña sobre un solo portaobjetos y se hace una siembra de los mismos en agar Sabouraud, Mycosel y Sabouraud adicionado con cloranfenicol. Los fragmentos

sobrantes se utilizaran para realizar exámenes directos con KOH al 20 % y negro de clorazol si así se requiriera.

Aspirados, lavados

Los aspirados y lavados se reciben en recipientes estériles de plástico. Se procesan sembrando la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo de agar Sabouraud y en un tubo de agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol. La muestra restante se coloca en un tubo cónico y se agrega KOH al 20% en una relación 1:1 para mucolizar la muestra y también con la finalidad de que el KOH aclare las estructuras fúngicas que pudieran estar presentes.

Líquidos cefalorraquídeos.

El manejo de esta muestra se debe realizar con extrema precaución debido a que la toma de muestra es un proceso invasivo y doloroso, además de la dificultad que representa en pacientes pediátricos.

Se abre el contenedor en ambiente de esterilidad y con ayuda de una pipeta Pasteur se coloca todo el contenido en un tubo cónico estéril se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos para concentrar los microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra así como otros elementos. Una vez finalizada la centrifugación se procede a decantar el contenido del tubo dejando una única gota en el fondo con la que se resuspende el precipitado (de haberse formado alguno) se realizan dos exámenes directos uno usando KOH 20% y el segundo con tinta china con la finalidad de detectar la presencia de *Cryptococcus sp.* También se siembra la muestra en agar Sabouraud, agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol y Mycosel.

Sangre.

Las muestras de sangre que se reciben en el laboratorio están contenidas en los frascos de cultivo BACTEC Myco/F Lytic, para uso con el equipo automatizado BACTEC 9000MB. Una vez recibidas las muestras se registran y se colocan en el equipo BACTEC 9000MB. Los frascos de cultivo BACTEC Myco/F Lytic poseen un indicador en el fondo de los mismos que cambia en presencia de CO₂ producido durante el metabolismo de los microorganismos, este cambio es detectado por el BACTEC 9000MB. Cuando el equipo determina que un hemocultivo es negativo después de un mes, es decir no hubo un cambio significativo en el indicador, se saca del aparato y se desecha. Si el cultivo es identificado por el BACTEC 9000MB como positivo se retira y se procesa. Se agita suavemente el frasco para homogenizar la muestra y evitar la formación de conglomerados de glóbulos rojos que pudieran dificultar la lectura del examen directo al microscopio. En ambiente de esterilidad se limpia la tapa del frasco con una gasa con alcohol. Se perfora con una jeringa y se toma 1mL del hemocultivo se coloca una gota en un portaobjetos para elaborar el examen directo y se vacía suficiente en un tubo de Sabouraud con cloranfenicol cubriendo la superficie del medio, si llegara a sobrar muestra se desecha en contenedor correspondiente. Se incuba el tubo a 28° C y se revisa periódicamente si hay crecimiento. Al presentarse crecimiento se realiza un examen directo de la(s) colonia(s) con azul de lactofenol y se procede a realizarse la lectura en el microscopio. De tratarse de una colonia de levaduras estas son sembradas en medio cromogénico y se continúa con el proceso de tipificación.

Muestras de bacteriología

Las muestras que son canalizadas del laboratorio de bacteriología están sembradas en cajas de agar Sabouraud o en CHROMAgar®. Cuando las colonias se encuentran en agar Sabouraud es necesario hacer un examen directo de las colonias con Azul de lactofenol y observar al microscopio para verificar que se

trate de levaduras. Si se trata de bacterias el proceso en el laboratorio de micología termina, en caso de tratarse de levaduras se procede a resembrar una colonia aislada. La resiembra se realiza en una caja de CHROMAgar® que se incuba por 48 hrs para su posterior lectura.

Cuando las cajas que provienen del laboratorio de bacteriología contienen colonias sembradas en CHROMAgar® solo se incuba hasta que la caja cumpla con el plazo de 48 hrs para su lectura adecuada.

Diagrama 1. Metodología general para el procesamiento de muestras dentro del Laboratorio de Micología.

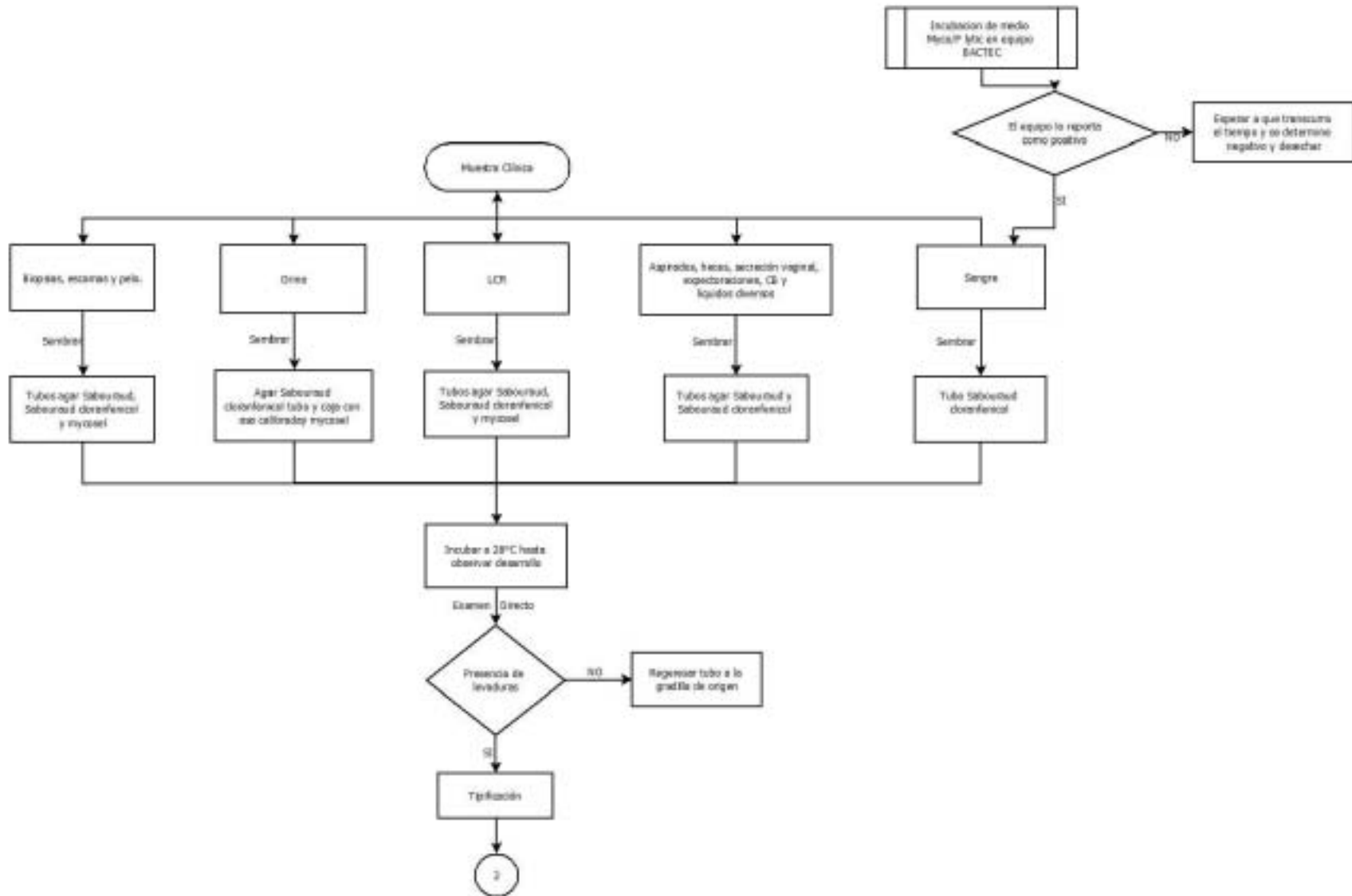
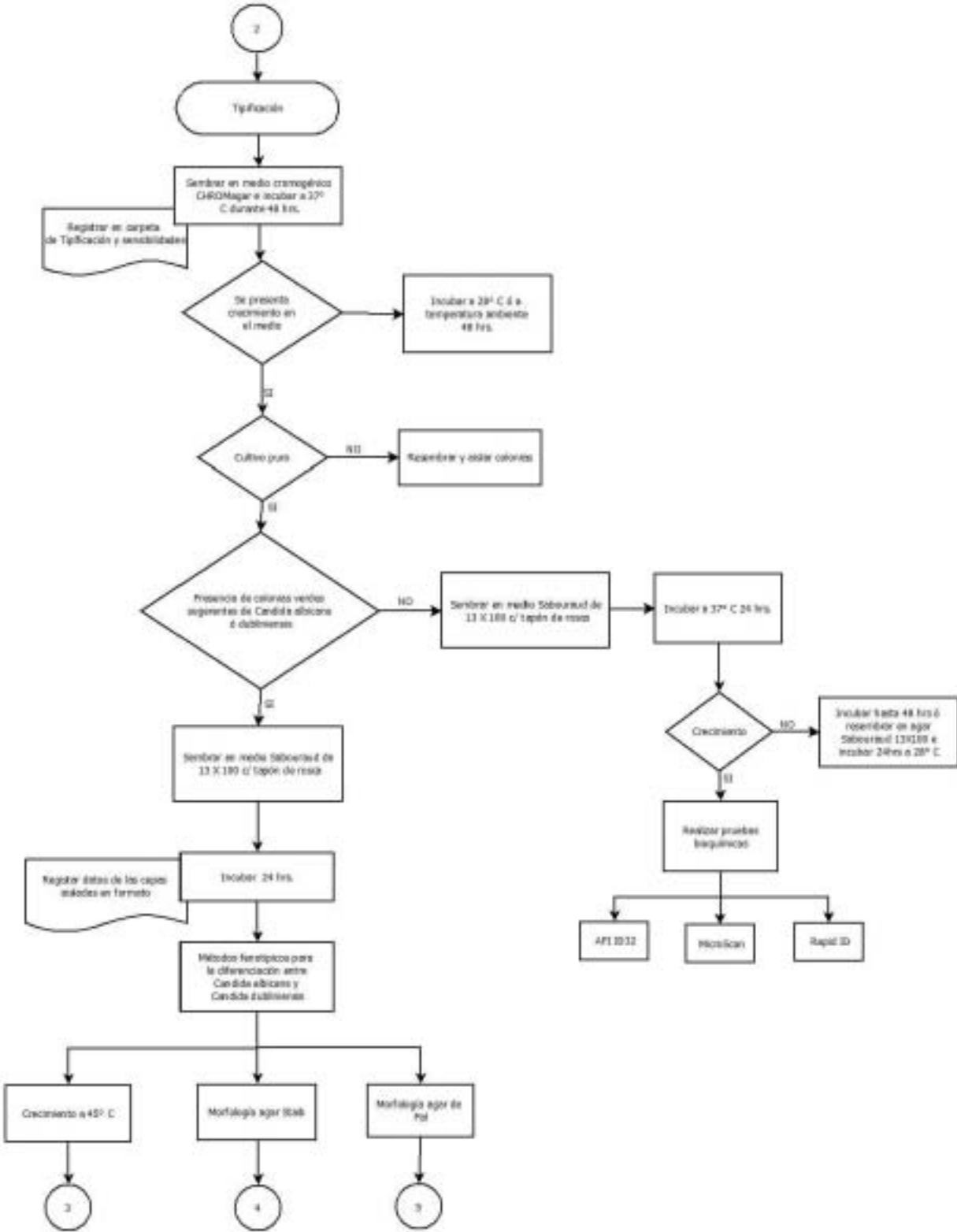


Diagrama 2. Proceso de Tipificación de levaduras



Identificación de las levaduras.

Medio cromogénico

Todas aquellas cepas que sean identificadas como levaduras por medio del examen directo son sembradas por agotamiento en medio cromogénico CHROMAgar® *Candida*, para obtener colonias aisladas. Se incubó a 37 °C durante 48 horas.

Una vez obtenidos los resultados en CHROMAgar® se procede a seleccionar las colonias verdes (probables *Candida albicans* y probables *Candida dubliniensis*) y se resiembran en agar Sabouraud tubo chico de 13X100 mm para proceder con las tres diferentes metodologías a aplicar.

Para este estudio se incluyeron aspirados nasofaríngeos, orina, secreciones bronquiales, aspirado bronquial, sangre, cavidad bucal, escamas de piel, absceso hepático, secreción vaginal, secreción traqueal, secreción de absceso y secreción eritematosa.

Pruebas fenotípicas diferenciales.

Para la diferenciación de las dos especies se realizaron dos pruebas morfológicas en dos medios de cultivo: agar Staib (ASt) y agar de Pal (AP).

A partir del crecimiento de 24 horas en SDA a 28°C, cada uno de los aislamientos obtenidos de pacientes así como las cepas ATCC de *Candida dubliniensis* (CD36) y *Candida albicans* (90028 y 66027) se inoculó en la mitad de una caja Petri realizando cuatro estrías en cada mitad de la caja con una separación aproximada de 0.5 cm. a continuación se colocaba un cubreobjetos estéril sobre las estrías se incubó a 30 °C durante 48 hrs. Se observaron las características coloniales, superficie, forma color, y la presencia o ausencias de halo de pseudofilamentos alrededor de la colonia. Posteriormente se colocó una gota de azul de algodón sobre las estrías que se encontraban descubiertas y se observó al microscopio en búsqueda de clamidoconidios.

Crecimiento a 45 °C.

Se realizó la prueba de termotolerancia a 45 °C en agar dextrosa Sabouraud (ADS), es posible utilizar opcionalmente Agar papa dextrosa para esta prueba. A partir de crecimiento colonial de 24 horas en ADS a 28 °C de cada uno de los aislados del estudio, se realizó una suspensión que se estandarizó con el tubo 2 de la escala de Mc Farland. Posteriormente se realizó la siembra de las cajas por estría cerrada en la superficie del agar usando un asa calibrada de 10µL, se incubaron durante 48 horas. Revisando crecimiento a las 24 y 48 horas. Se observó la presencia o ausencia de crecimiento en las cajas, se catalogó el crecimiento como normal (++++), crecimiento moderado (++) y ausencia de crecimiento (-).

La interpretación de las pruebas se resume en la siguiente tabla.

Pruebas	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Agar Staib	-Colonias de superficie lisa y blanquecina. Al microscopio ausencia y o escasos clamidoconidios únicos.	Colonias de superficie rugosa y blanquecina, presencia de halo de pseudohifas. Al microscopio clamidoconidios en racimo.
Agar de Pal	-Colonias de superficie lisa y blanquecina. Al microscopio ausencia y o escasos clamidoconidios únicos.	Colonias de superficie lisa y blanquecina presencia de halo de pseudohifas. Al microscopio clamidoconidios en racimo.
Termotolerancia	-Crecimiento a 45°C	-Ausencia de crecimiento a 45°C

Tabla 2. Criterios para la identificación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* por pruebas diferenciales fenotípicas.

Una vez realizadas la lectura de las pruebas se procedió a registrar las características y a determinar aquellos aislamientos que pudieran tratarse de una cepa de *Candida dubliniensis*.

Las cepas sospechosas así como la cepa ATCC de *C. dublniensis* CD36 se sometieron a identificación por medio del kit comercial API® Yeast ID32.

Diagrama 3. Prueba de crecimiento a 45° C

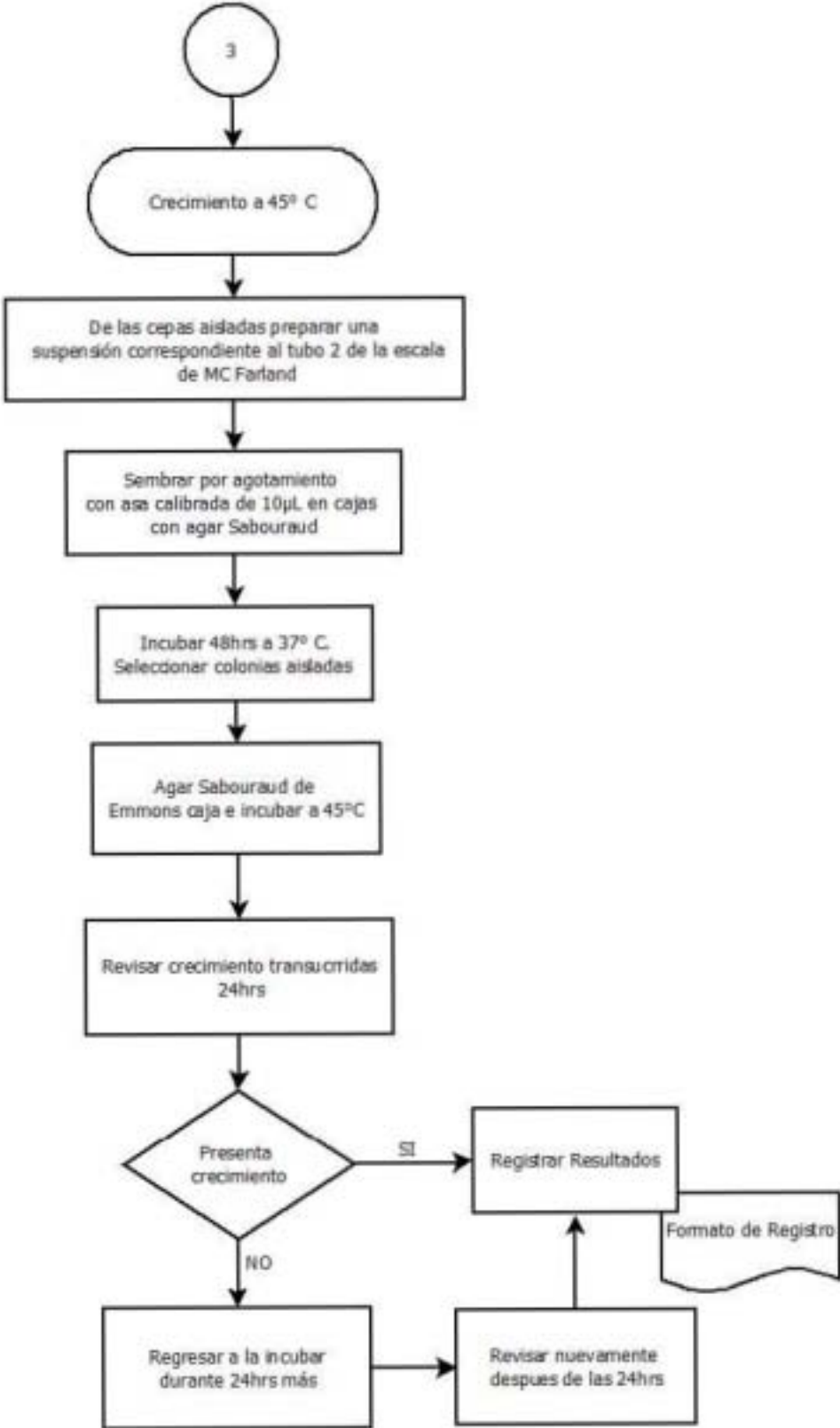


Diagrama 4. Desarrollo en Agar Staib macro y micromorfología.

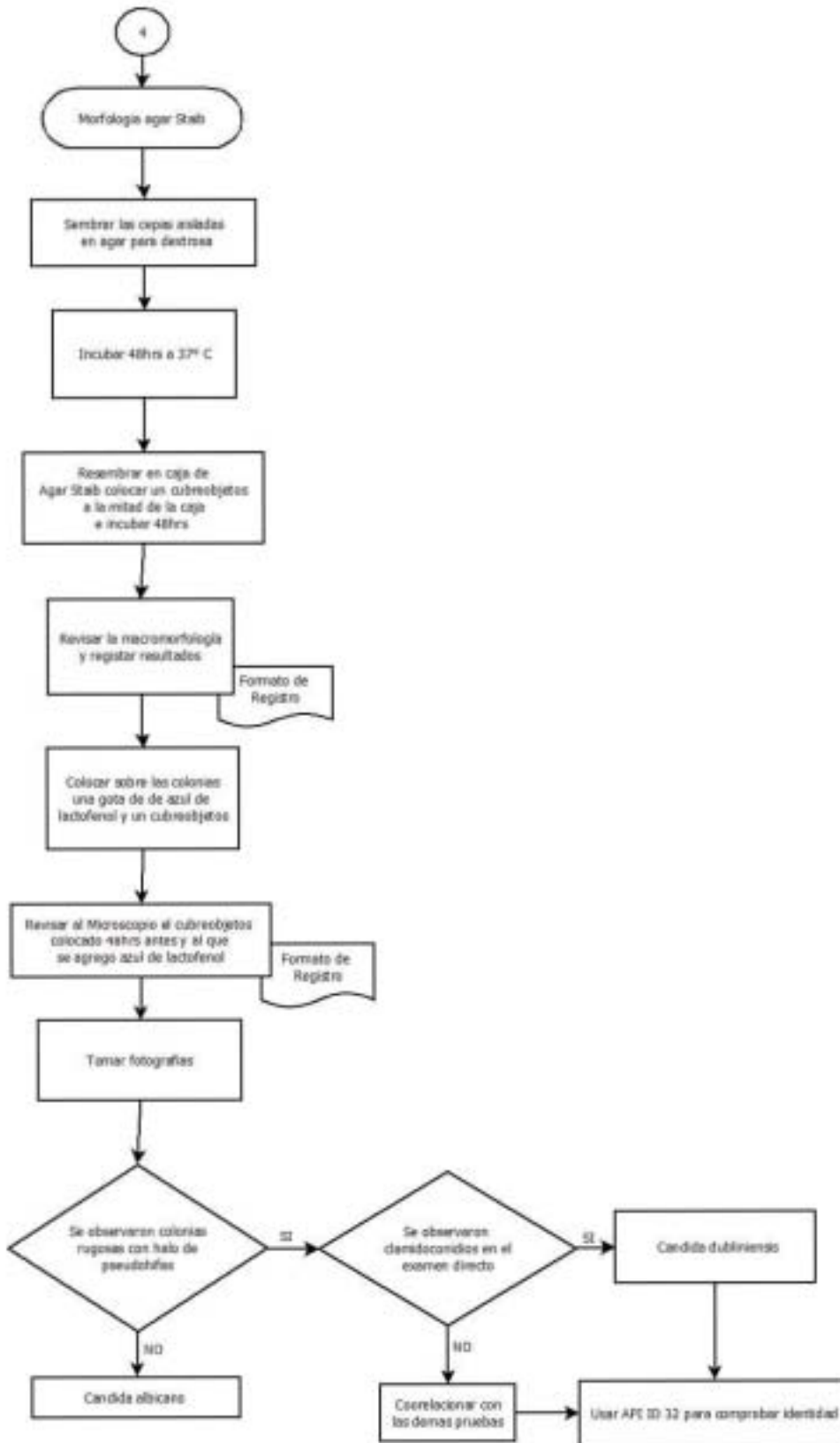
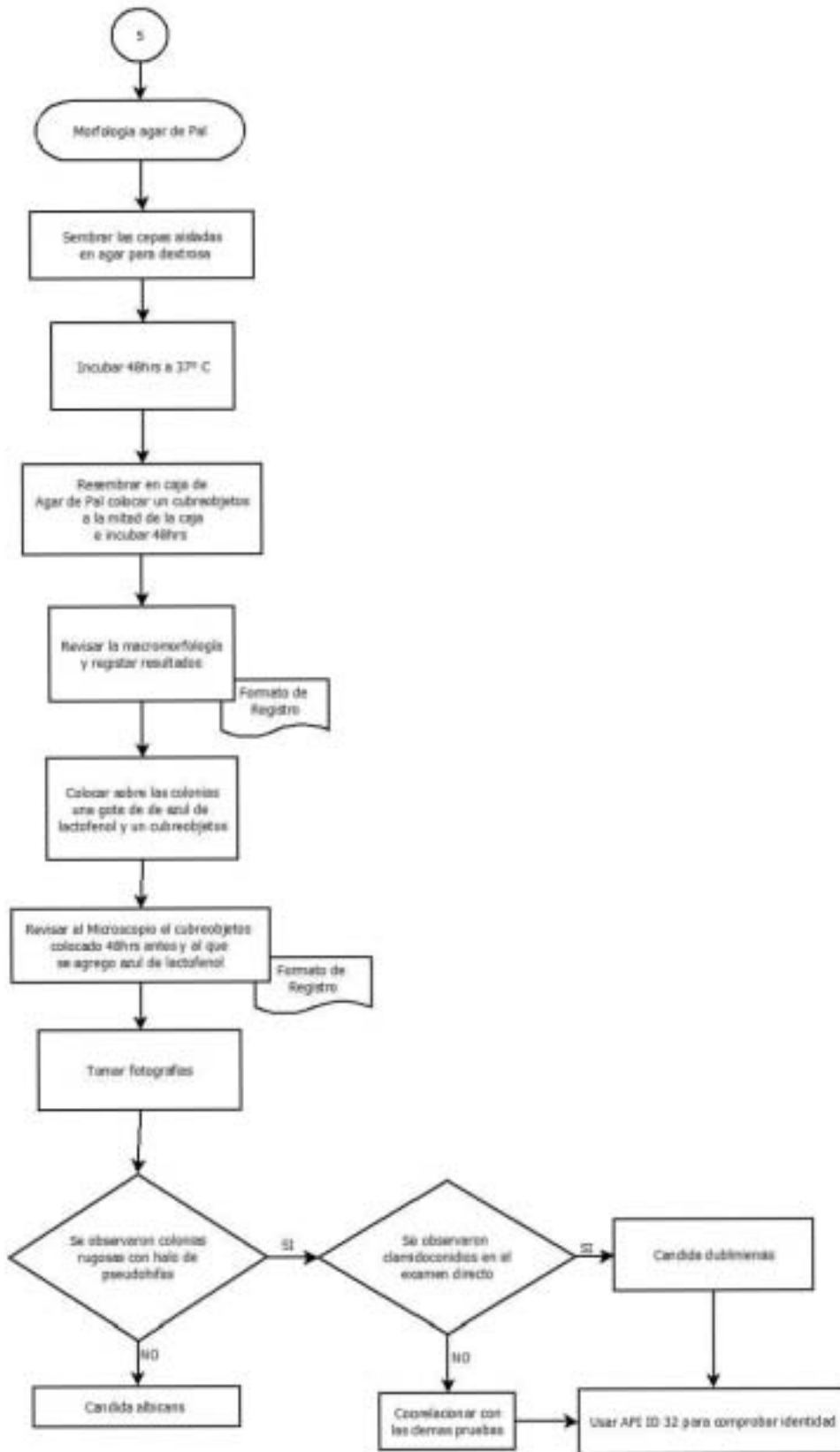


Diagrama 5. Desarrollo en Agar de Pal macro y micromorfología.



Tipificación con Galería ID32 C.

Esta galería es un sistema estandarizado producido por bioMérieux, la galería está compuesta por 32 diferentes pruebas de asimilación miniaturizados que permite identificar 62 diferentes especies y géneros de levaduras.

Como se menciona anteriormente las galerías se encuentran formadas por 32 cúpulas, 29 de las cuales contienen un sustrato de carbono deshidratado, un control negativo (0), una cúpula para determinar la sensibilidad a la cicloheximida y la última que determina colorimétricamente la esculina.

Composición cúpulas

Prueba	Sustratos	Prueba	Sustratos
GAL	D-Galactosa	SOR	D- sorbitol
ACT	Ciloheximida (Actidiona)	XYL	D-xilosa
SAC	D-sacarosa	RIB	D-ribosa
NAG	N-acetil-glucosamina	GLY	Glicerol
LAT	Ácido láctico	RHA	L-rhamnosa
ARA	L-arabinosa	PLE	Palatinosa
CEL	D-celobiosa	ERY	Eritritol
RAF	D-rafinosa	MEL	D-melibiosa
MAL	D-maltosa	GRT	Glucuronato sódico
TRE	D-trehalosa	MLZ	D-,elecitosa
2KG	2-cetoGluconato potásico	GNT	Gluconato sódico
MDG	Metil- α -D- Glucopiranosida	LVT	Acido levulinico (levulinato)
MAN	D-manitol	GLU	D-glucosa
LAC	D-lactosa(origen bovina)	SBE	L-sorbosa
INO	Inositol	GLN	Glusocamina
0	Sin sustrato	ESC	Esculina Citrato férrico

Tabla 3. Composición cúpulas API ID 32.

Obtención de las colonias. Para todos aquellos aislamientos que presentaron características que hicieran sospechar de una posible *Candida dubliniensis* se realizó una resiembra a partir del tubo de origen de las pruebas de tipificación fenotípica a un nuevo tubo de SDA donde se cultivó por un periodo de 24 horas a 28 °C.

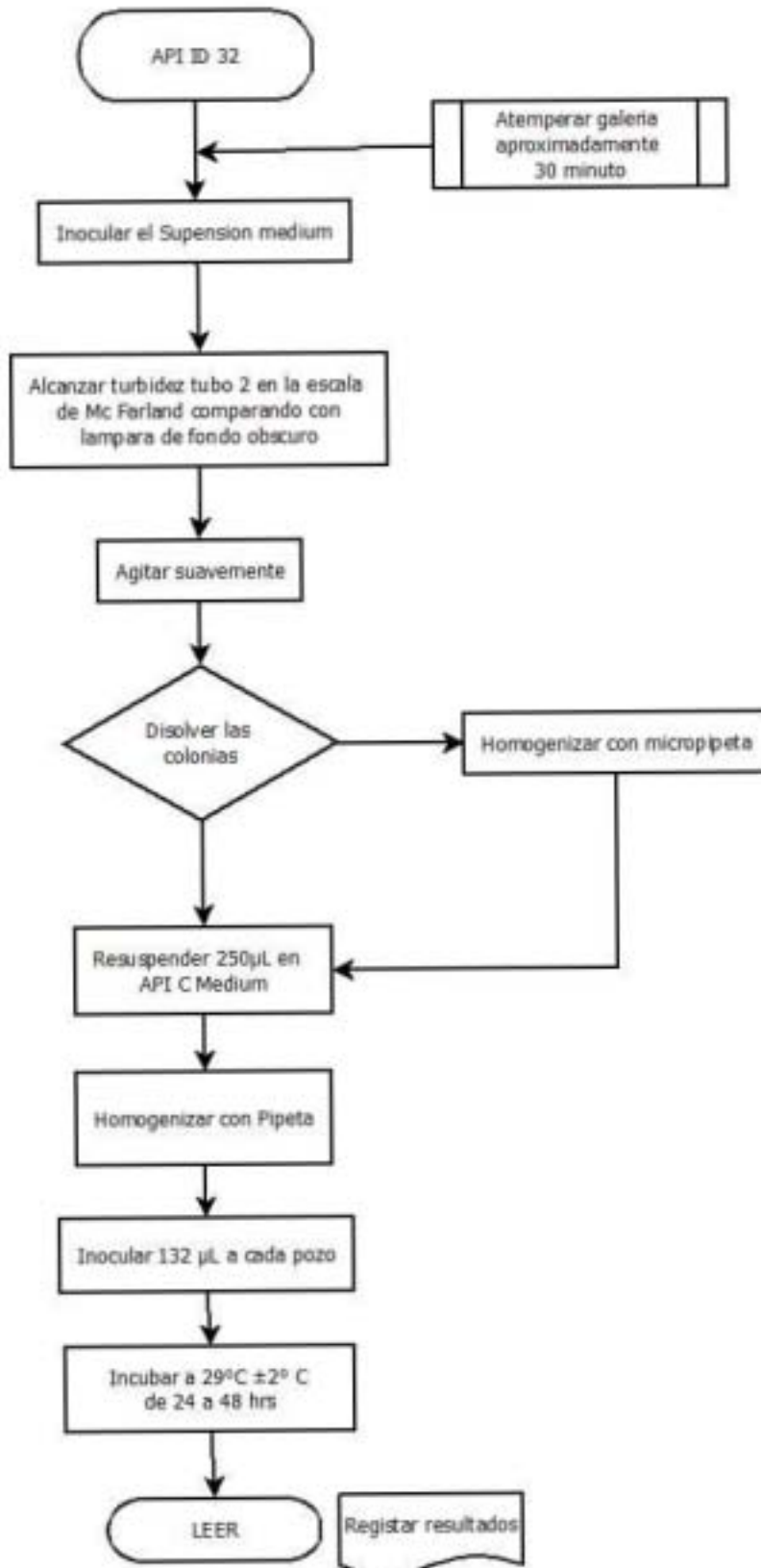
Preparación del inóculo. Se abre una ampolla de API® Suspension Medium (mL) introduciendo la ampolla en el protector y mientras se sujeta verticalmente se empuja para abrir. También es posible utilizar un tubo que contenga 2 mL de agua destilada sin aditivos. Se toman las colonias de interés a partir de cultivos jóvenes (24-49 horas) y se prepara una suspensión de turbidez igual al patrón de 2 de McFarland, se compara contra un factor de turbidez. Se procede a abrir una ampolla de API C Medium como previamente se mencionó y se transfieren 250 µL de la suspensión precedente. Es importante que esta solución se utilice de inmediato.

Inoculación de la galería. Es importante homogenizar la ampolla de API C Medium sembrada e inocular cada una de las galerías con 135 µL de suspensión por cúpula con ayuda de una micropipeta. Se debe tener cuidado de no tocar los pozos para evitar que el sustrato de un pozo contamine a otro y pueda darse lugar a falsos positivos. Una vez inoculados todos los pozos se cierra la tapa sobre la galería.

Lectura de la galería. Se comparan los pozos con el control (0) y se anotan todas los pozos que aparecen con turbidez como positivos.

Interpretación. La interpretación de la prueba se realiza visualmente observando donde hay turbidez que indique desarrollo del microorganismo y por lo tanto uso del sustrato del pozo, este patrón obtenido se compara con la tabla anexa al inserto de la ensayo.

Diagrama 6. Tipificación API ID 32



9.-RESULTADOS.

En este estudio se sometieron a la pruebas de tipificación y diferenciación un total de 90 aislados. De estos 90 aislados obtenidos de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría; el 44.4% (40 individuos) correspondieron al género femenino mientras el otro 55.6% (50 individuos) correspondió al género masculino. El intervalo de edad fue de 0 a 18 años, con un promedio de edad de 5.8 años.

Las muestras provenían de los siguientes servicios del hospital.

Del total de las muestras el 75.6 % provenía de pacientes hospitalizados, el 17.8% de pacientes externos y el 6.7% restante no estaba indicado en la requisición.

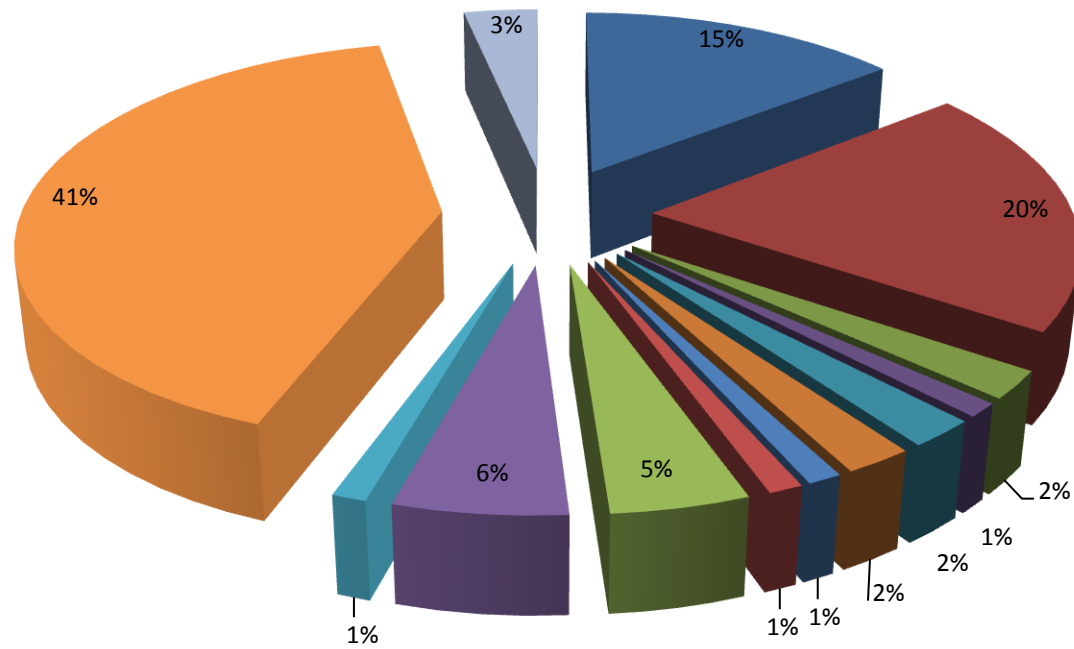
En la Gráfica 2 se muestra el origen del espécimen biológico, el cual está relacionado con la forma clínica de Candidosis, donde los principales fueron orina (41%), seguido de aspirado nasofaríngeo (ANF)(19%) y por último aspirados bronquiales(AB) (14%).

Servicio	No. Muestras	Porcentaje
Cardiología	2	2.22
Cirugía	5	5.56
Dermatología	1	1.11
Hematología	2	2.22
Hospitalización	1	1.11
Infectología	19	21.11
Immunología	4	4.44
Nefrología	2	2.22
Neonatología	7	7.78
Neumología	22	24.44
Neurología	2	2.22
Oncología	3	3.33
Otorrinolaringología	1	1.11
Quirófano	1	1.11
UCICV	3	3.33
Urgencias	5	5.56
UTIP	9	10.00
No se especifica	1	1.11
TOTAL	90	100

Tabla 3. Servicio de procedencia del paciente.

Muestras biológicas.

■ Aspirado Bronquial ■ ANF ■ Aspirado Traqueal ■ Absceso hepático ■ Absceso
■ Escamas ■ Esputo ■ LBA ■ Cavidad Bucal ■ Sangre
■ Secreción vaginal ■ Orina ■ Secreción

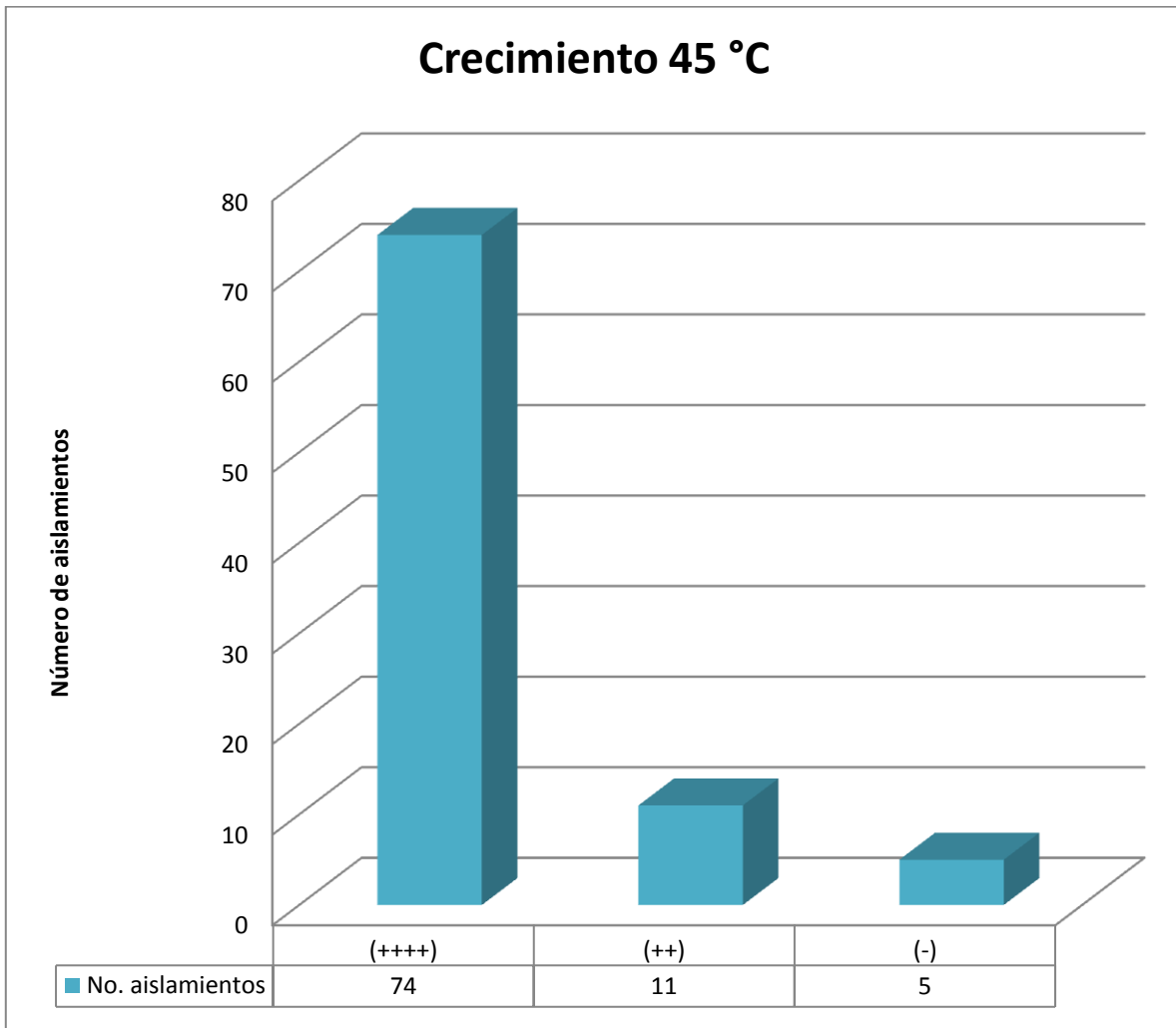


Gráfica 2 Materiales biológicos a partir de los que se aislaron las distintas cepas.

Tipificación.

Prueba de termotolerancia.

Para la prueba de termotolerancia 74 aislados presentaron un crecimiento normal (++++), 11 de los aislados presentaron un crecimiento moderado (++) y solo 5 de los aislados no presentaron crecimiento (-).



Gráfica 3. Crecimiento a 45° C el crecimiento se representó por un sistema de cruces normal (++++), moderado (++) y ausencia crecimiento (-).

Crecimiento Agar Staib.

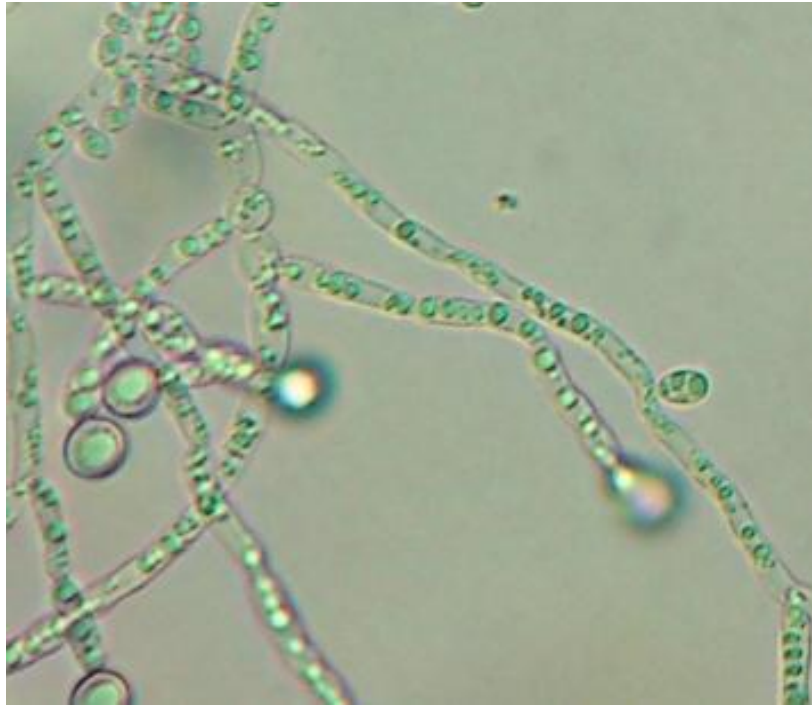
Para la prueba de crecimiento en agar de Staib se observaron las características macroscópicas y microscópicas de las cepas ATCC de *Candida albicans* así como *Candida dubliniensis*. Y se correlaciono con las observaciones realizadas en aislados provenientes de pacientes.

Cepas ATCC.

Candida dubliniensis CD36



Fotografía No 1. Colonias lisas cremosas y con presencia de un halo de pseudohifas alrededor de las mismas.

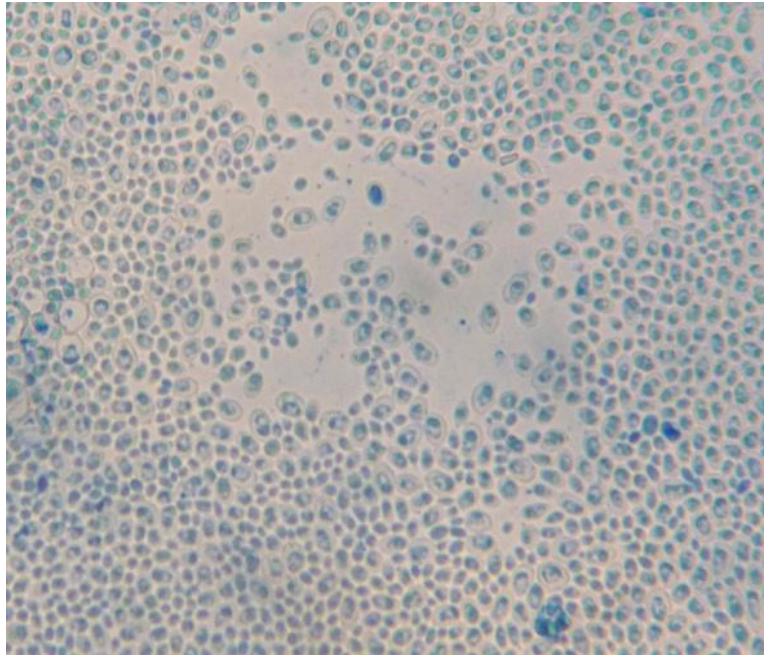


Fotografía No.2. Microscópicamente se observo pseudohifas y blastoconidios y en algunos campos se observaba clamidoconidios.

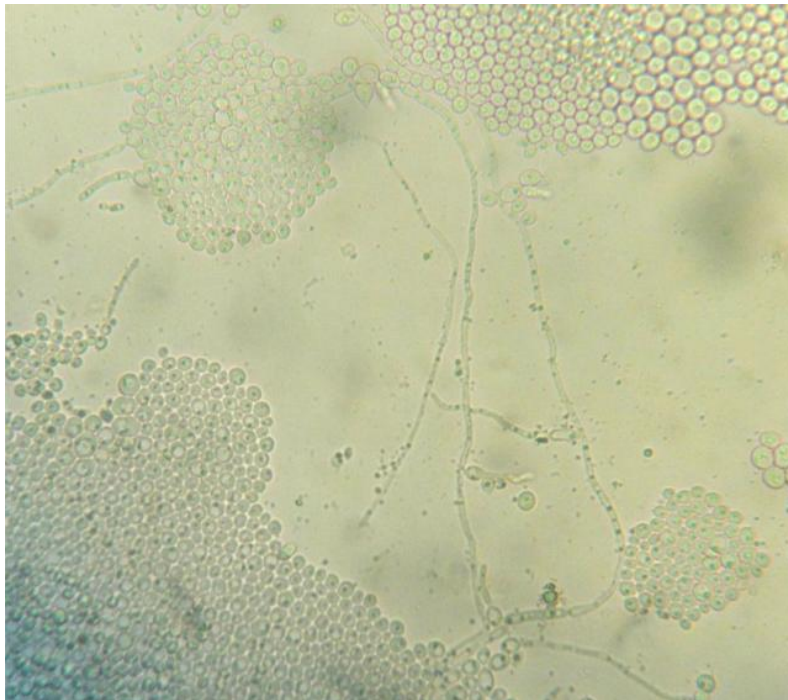
***Candida albicans* 90028**



Fotografía No.3. Macroscópicamente se observan colonias blancas cremosas y de superficie lisa.

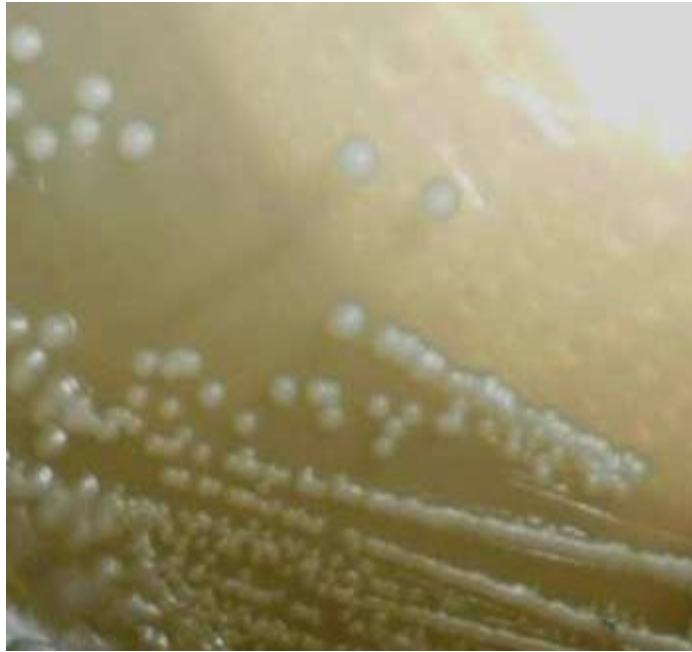


Fotografía No.4. Microscópicamente en donde se colocó el cubreobjetos después de las 48 hrs solo se encontraron blastoconidios.

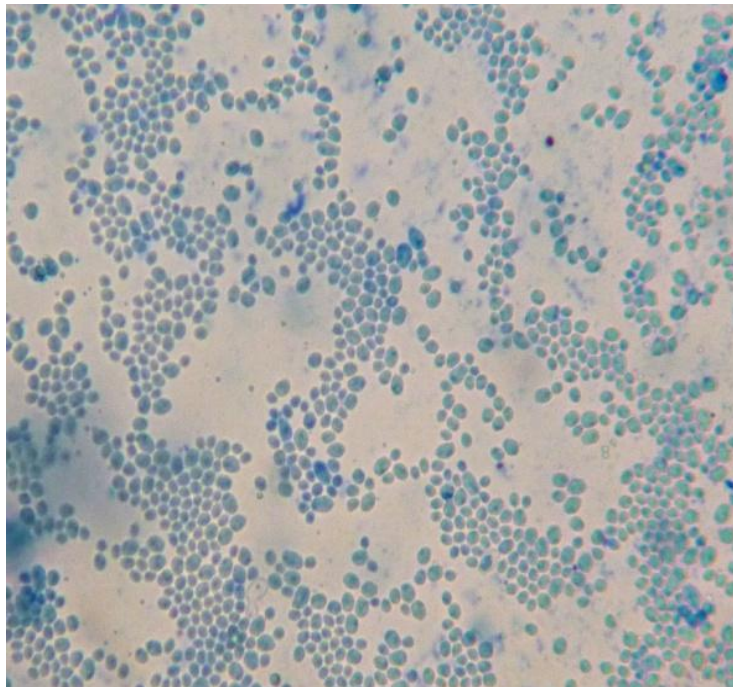


Fotografía No.5. Sin embargo al observar al microscopio el cubreobjetos que fue colocado con al momento de inocular las cajas y que lleva un tiempo de 48 horas se pueden observar blastoconidios asi como pseudohifas.

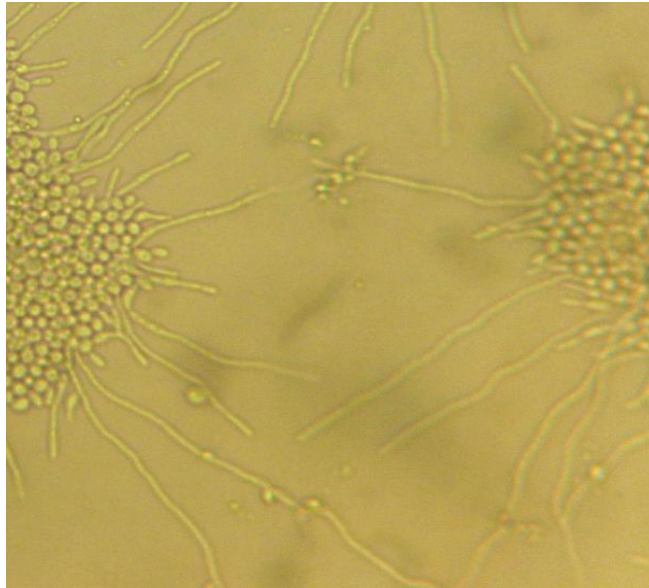
***Candida albicans* 66027**



Fotografía No.6. Colonialmente se observaron colonias blancas cremosas y de superficie lisa no había presencia de halo de pseudohifas.



Fotografía No.7. En donde se colocó el cubreobjetos después de las 48 hrs de incubación solo se observaron microscópicamente blastoconidios.



Fotografía No.8. Al observar al microscopio el cubreobjetos que fue colocado con al momento de inocular las cajas y que lleva un tiempo de 48 horas se pueden observar blastoconidios así como pseudohifas

Cepas de pacientes.

En las cepas de pacientes, 87 cepas se observaron como colonias blancas y cremosas con ausencia del halo de pseudohifas. Al realizar el examen directo con azul de lactofenol solo se observaron blastoconidios mientras que en cubreobjetos colocado 48 hrs atrás se apreciaban pseudohifas.

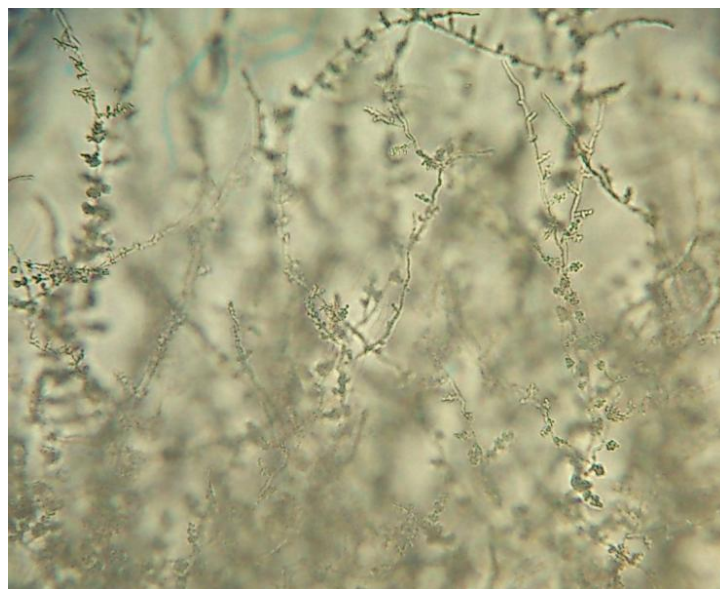


Fotografía No.9. Colonias blancas cremosas y de superficie lisa no había presencia de halo de pseudohifas.

De las cepas obtenidas de pacientes ninguna mostro producción de clamidoconidios, solo tres cepas produjeron halos de pseudohifas transcurridas las 48 horas de incubación, al microscopio también se encontró la presencia de pseudohifas.



Fotografía No.10. Cepas 11/15 y 11/17 en ambos casos se presentaron pseudohifas y blastoconidios, sin embargo no hubo presencia de clamidoconidios.

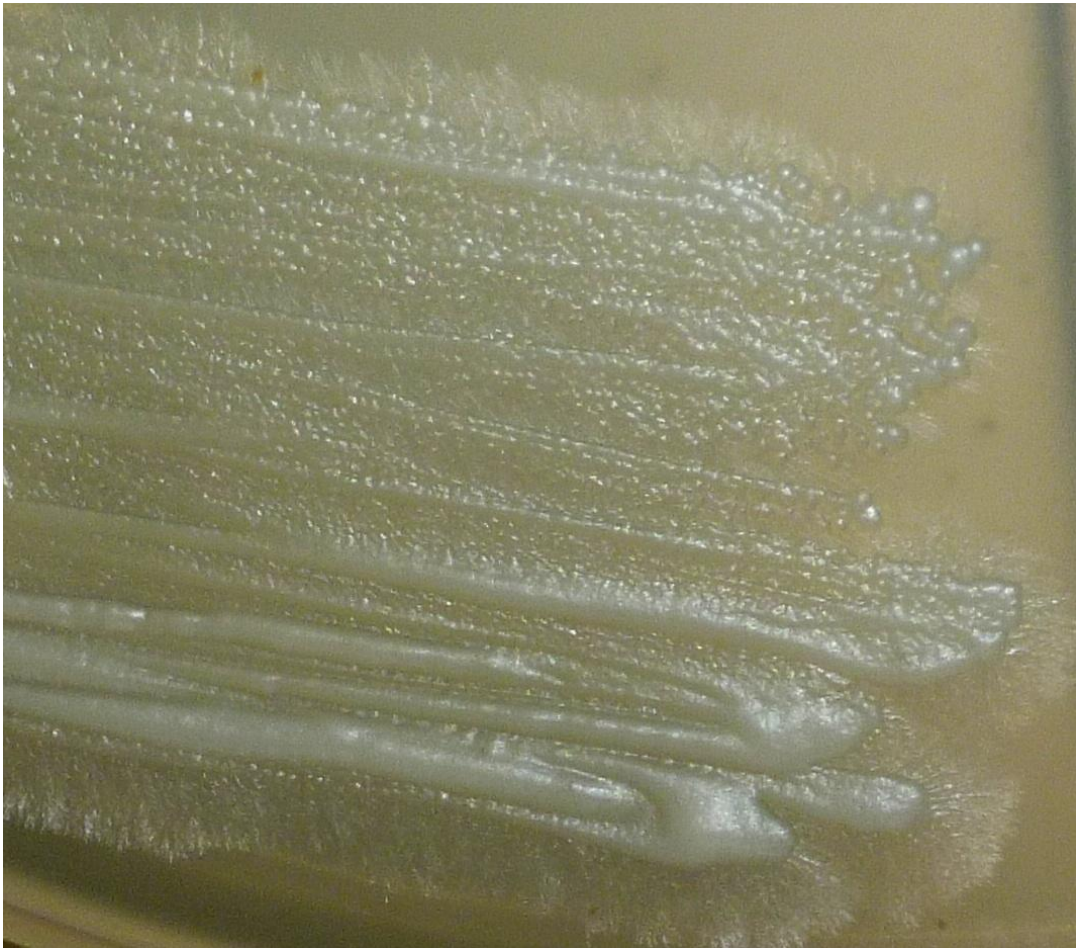


Fotografía No.11 En donde se coloco el cubreobjetos con 48 horas de anticipación la presencia de pseudohifas fue más evidente

Crecimiento Agar de Pal.

Cepas ATCC

***Candida dubliniensis* CD36**



Fotografía No.12 Colonias lisas cremosas y con presencia de un halo de pseudohifas alrededor de las mismas.

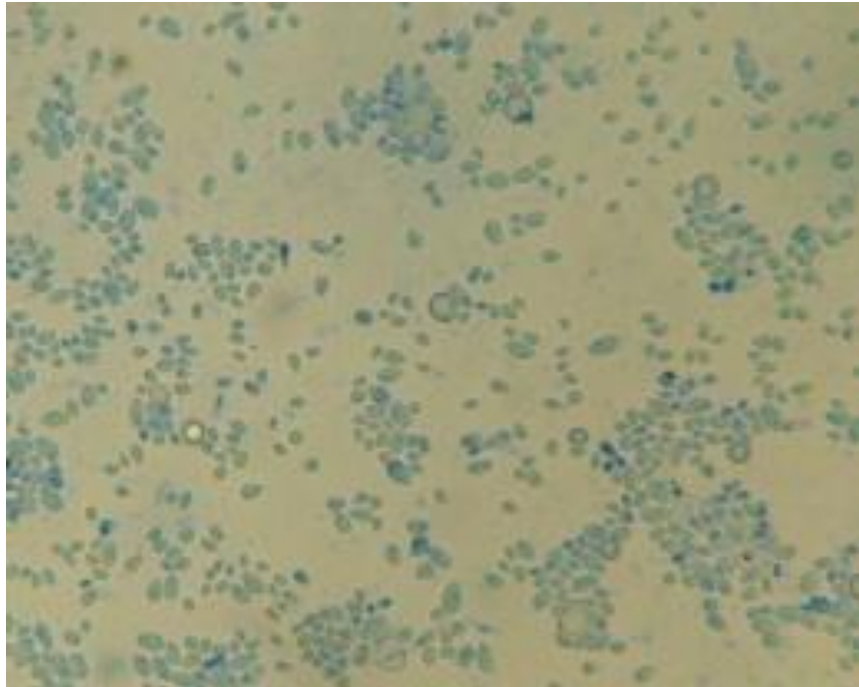


Fotografía No.13 Microscópicamente se observaba pseudohifas y blastoconidios y en algunos campos se observaba clamidoconidios.

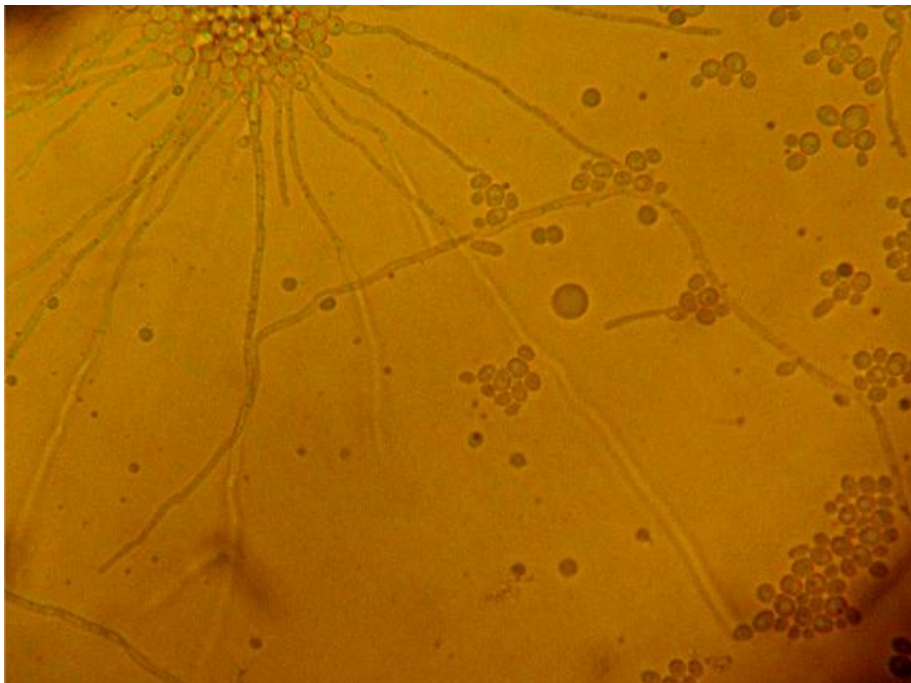
***Candida albicans* 90028**



Fotografía No.14 Macroscópicamente se pueden observar colonias blancas, de textura cremosa y con superficie lisa.



Fotografía No.15 Microscópicamente solo se observaron blastoconidios en todos los campos.



Fotografía No.16 Microscópicamente se observó la presencia de pseudohifas en donde el cubreobjetos fue colocado con 48 horas de anticipación.

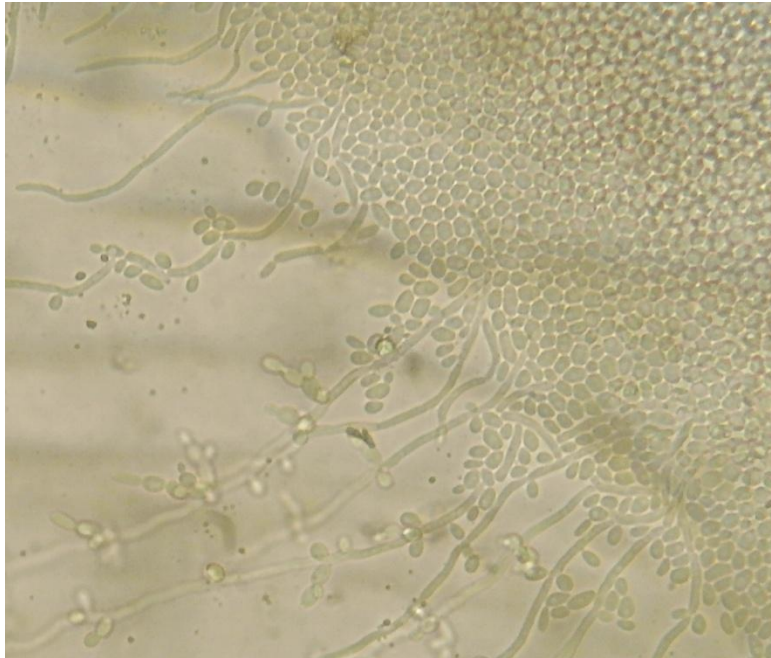
***Candida albicans* 66027**



Fotografía No.17 Colonialmente se observaron colonias blancas cremosas y de superficie lisa no había presencia de halo de pseudohifas.



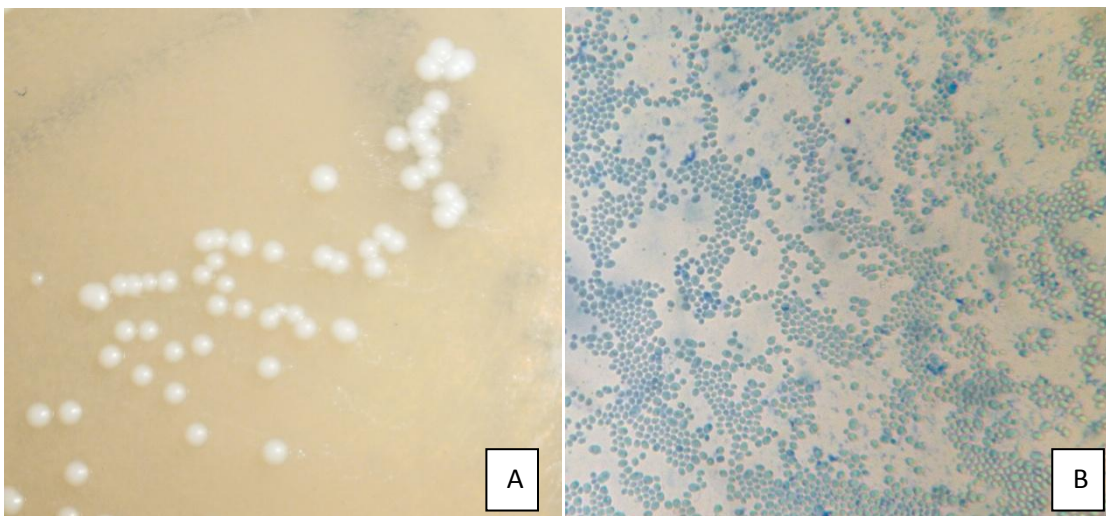
Fotografía No.18 Microscópicamente solo se encontraron blastoconidios en el examen directo donde se colocó azul de lactofenol y el cubreobjetos posteriores a la incubación de 48 horas.

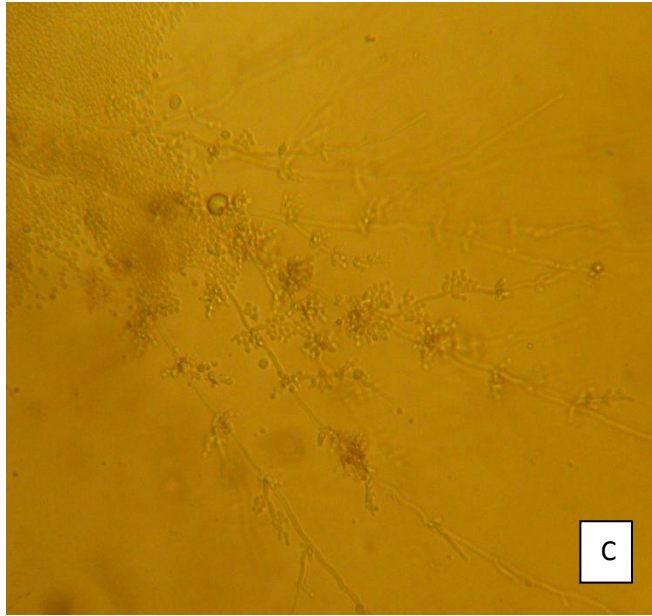


Fotografía No.19 En el cubreobjetos colocado con 48 hrs de antelación se observaba la formación de pseudohifas además de la presencia de blastoconidios.

Cepas de pacientes.

La mayoría de las cepas crecieron en el medio como colonias blancas y cremosas sin halo de pseudohifas



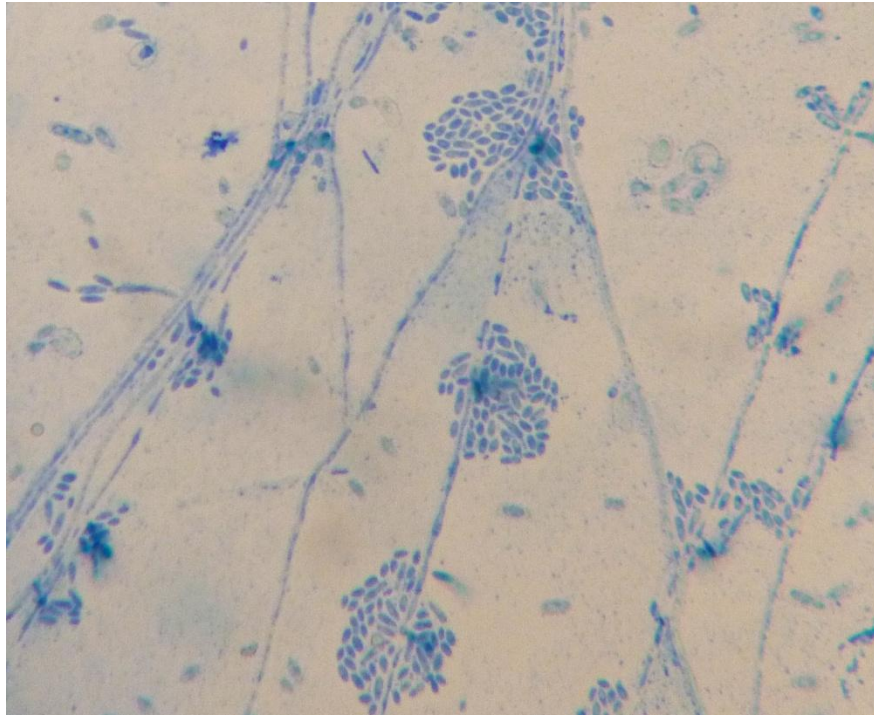


Fotografías No.20, 21 y 22 Colonias blancas sin halo de pseudohifas, características de *Candida albicans* (A), al examen directo con azul de lactofenol se observaron solo blastoconidios (B) mientras que donde se colocó el cubreobjetos con 48 hrs de antelación se observaron algunas pseudohifas sin presencia de clamidoconidios.

Nuevamente solo tres cepas presentaron halo de pseudohifas además de que en el examen directo se observaron pseudofilamentos pero ausencia de clamidoconidios



Fotografía No.23 Colonias con ligero halo de pseudohifas al alrededor



Fotografía No.24. Presencia de pseudohifas en ninguno de los campos de las cepas observadas fue posible encontrar una clamidoconidios.

Tabla 4. Resultados resumidos de las pruebas fenotípicas realizadas se resalta aquellas cepas sospechosas de ser *C. dubliniensis* a las cuales se les realizo una identificación con el kit comercial API yeast ID 32

No. Cepa	No Mico.	Crecimiento	Agar de Pal			Agar de Staib		
			Macromorfología	Morfología Micro		Macromorfologia	Morfología Micro	
				48hrs	azul LF		48hrs	azul LF
1	01/13	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
2	02/33	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
3	12/26	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
4	11059	-	Presencia halo pseudofilamentos	ByP	ByP	Presencia halo pseudofilamentos	ByP	ByP
5	01/36	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
6	01/37	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
7	01103	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
8	11061	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
9	11/32	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
10	01008	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
11	01/18	++++	Ausencia halo	ByP	A.B	Ausencia halo	ByP	A.B

			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
12	01/33	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
13	01/02	-	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
14	01/03	-	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
15	01/25	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
16	01/30	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
17	01/09	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
18	11021	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
19	01119	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
20	08/20	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
21	08/21	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
22	08/08	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
23	08134	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
24	08097	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
25	08/15	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
26	09069	++++	Ausencia halo	ByP	A.B	Ausencia halo	ByP	A.B

			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
27	08/16	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
28	09053	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
29	07/10	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
30	09/14	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
31	08130	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
32	09015	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
33	07/16	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
34	09/06	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
35	09/09	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
36	09080	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
37	09040	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
38	08107	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
39	08123	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
40	07/09	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
41	10123 (2)	++++	Ausencia halo	ByP	A.B	Ausencia halo	ByP	A.B

			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
42	10138	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
43	10143	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
44	10146 (2)	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
45	10/46	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
46	10/52	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
47	10/57	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
48	10/59	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
49	11/01	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
50	11/06	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
51	11/07	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
52	11/08	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
53	11/10	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
54	11/11	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
55	11/14	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
56	11/15	++++	Presencia halo	ByP	ByP	Presencia halo	ByP	ByP

			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
57	11/17	++++	Presencia halo pseudofilamentos	ByP	ByP	Presencia halo pseudofilamentos	ByP	ByP
58	11/18	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
59	11/26	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
60	11/27	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
61	11/30	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
62	11/31	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
63	11/33	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
64	11/34	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
65	11/36	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
66	11/35	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
67	11/38	++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
68	12/25	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
69	12/28	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
70	12/34	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
71	12050	++++	Ausencia halo	ByP	A.B	Ausencia halo	ByP	A.B

			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
72	12079	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
73	01/07	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
74	01/10	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
75	01/12	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
76	01/17	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
77	01/23	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
78	01/31	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
79	01/34	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
80	01019	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
81	01032	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
82	01052	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
83	01055	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
84	01088	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
85	01102	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
86	01106	++++	Ausencia halo	ByP	A.B	Ausencia halo	ByP	A.B

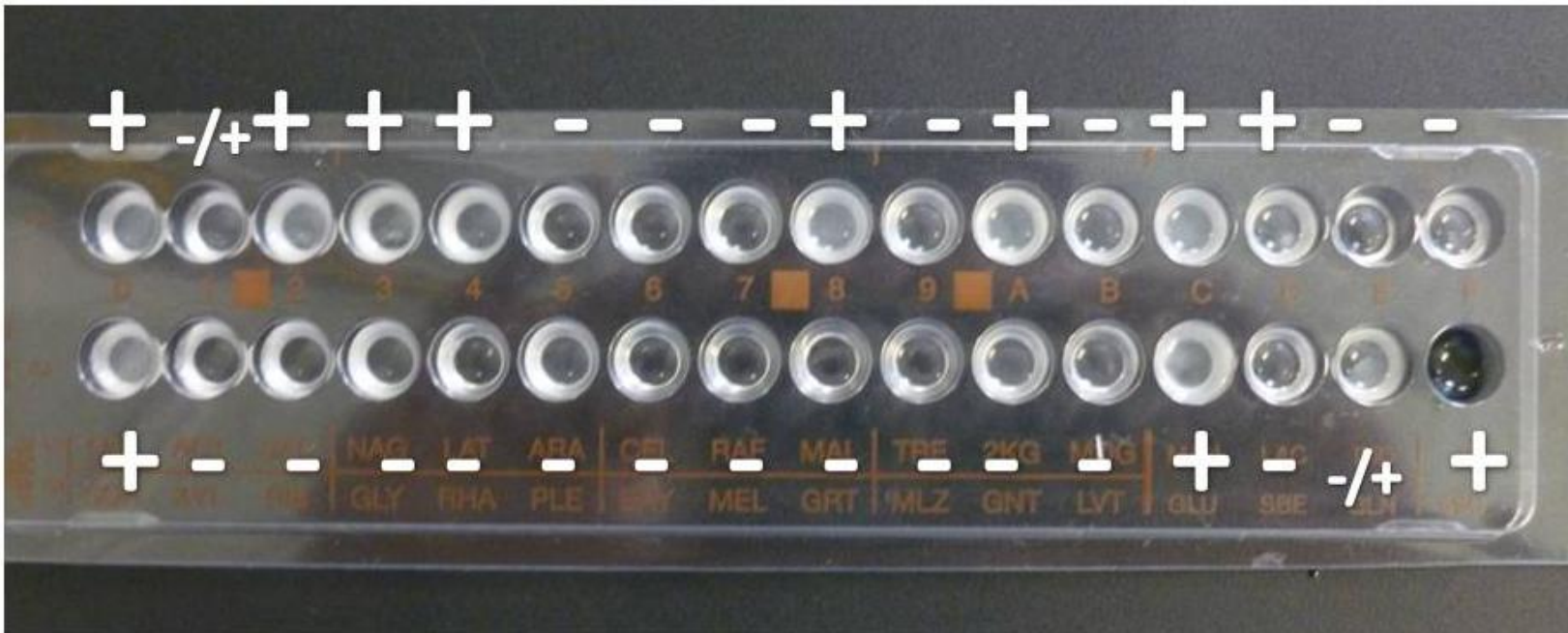
			pseudofilamentos			pseudofilamentos		
87	01/09	-	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
88	01/22	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
89	01047	-	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B
90	01114	++++	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B	Ausencia halo pseudofilamentos	ByP	A.B

ByP= Blastoconidios y pseudofilamentos. A.B = Abundantes blastoconidios

Tres de las cepas analizadas presentan una o varias características que las señalan como probables *C. dubliniensis* la cepa 11059, 11/17 y 11/15. Estas tres cepas se sometieron a identificación con API ID 32.

Api ID32

Cepa ATCC *Candida dubliniensis* CD36



Fotografía No. 35. Patrón de pruebas obtenido para la cepa ATCC de *Candida dubliniensis* CD36.

Patrón de cepa CD36 *Candida dubliniensis*

GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	0
+	-/+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+/-	+

El patrón obtenido se comparo con la tabla de identificación de especies de kit comercial ID 32 C contenida en el inserto y se determino que en efecto la cepa ATCC se trataba de *Candida dubliniensis*. Es importante notar que las pruebas de xilosa y trealosa son negativas, estas dos pruebas son positivas en *Candida albicans*, recordando que el crecimiento en a medio con xilosa es una prueba importante para la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

Aislados de pacientes.

Las cepas sospechosas de ser *Candida dubliniensis* fueron la 11059, 11/15 y la 11/17 los patrones obtenidos fueron los siguientes.

Cepa 11/15

GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	0
+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	-
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
+	+	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+-	-	+	-	+	+

El patrón obtenido se comparo nuevamente con la tabla de identificación de especies y se identifico a la cepa 11/15 como *Candida albicans* 1.

Cepa 11/17

GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	0
+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+	-	+	-	-	-
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

Esta cepa fue identificada como *Candida albicans* 2.

Cepa 11059

GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	0
+	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
+	+	-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

En base al patrón obtenido se identifico a la cepa como una *Candida albicans* 1.

10.-ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Los aislamientos que se utilizaron para la elaboración de este trabajo provenían de una población de pacientes pediátricos, todas las cepas que se sometieron al estudio fueron identificadas tentativamente como *Candida albicans*, este estudio se realizó con la finalidad de determinar la incidencia de *Candida dubliniensis* en la población general del Instituto Nacional de Pediatría además de demostrar que las características fenotípicas empleadas para la diferenciación de las cepas son de utilidad en un laboratorio de rutina debido a sus costos y a la cantidad de muestras que se pueden procesar por estos medios.⁴⁴

Las infecciones por el género *Candida* son infecciones oportunistas que atacan generalmente a personas inmunosuprimidas, aunque también atacan a pacientes sanos, en los últimos años dentro del Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría se ha observado que de las afecciones causadas por levaduras alrededor del 50% son causadas por *Candida albicans*,. Esto puede ser debido a que esta levadura es la que se encuentra presente en muchos sitios anatómicos como lo son las mucosas y dentro de un hospital los pacientes en ocasiones tiene algún problema de inmunosupresión lo que es aprovechado por estas levadura oportunistas para comenzar una infección.⁸⁻¹⁰

El estudio se enfocó en la búsqueda de *Candida dubliniensis* una especie que debido a sus características es comúnmente confundida y tipificada como *Candida albicans*. *Candida dubliniensis* fue descubierta en 1995 esta nueva especie también tiene características propias que la hacen de interés como la capacidad de generar resistencia a fluconazol así como a otros azoles, cuando el paciente se encuentra en tratamiento con estos fármacos posee la habilidad de aumentar su adhesión a los tejidos del hospedero al contrario de lo que ocurre con *Candida albicans* por lo que después de un tratamiento prolongado con azoles se produce un recambio de la microbiota de las mucosas por *Candida dubliniensis*. También se encuentra su habilidad de producir biofilms en conjunto con células de la misma levadura y con algunas bacterias, característica que le confiere protección contra

el ataque de neutrófilos así como de diversos fármacos que se utilizan en el tratamiento de infecciones ocasionadas por la misma. Esta levadura como las demás del género *Candida* es una levadura oportunista y ataca principalmente a pacientes con problemas de inmunosupresión y fue descubierta y aislada por primera vez de pacientes infectados con VIH. ¹⁻⁶

Al realizar el estudio no se enfocó en los aislados de pacientes que presentaban algún tipo de inmunosupresión debido a que era de interés saber si alguno de los aislados que previamente se habían tipificado como *Candida albicans* era en realidad una *Candida dubliniensis*. El rango de edad de los pacientes fue de los 0 hasta los 18 años y la edad promedio fue de 5.8 años. El género en los pacientes no se considera como un factor de importancia para el desarrollo de una infección por estas levaduras.

En la prueba de crecimiento solo cinco de los 90 aislados utilizados para el estudio no presentaron crecimiento esta prueba puede ser realizada también a 45 ° C pero se escogió esta temperatura como la más adecuada ya que es una temperatura a la cual las cepas de *Candida albicans* continúan desarrollándose mientras que las cepas de *Candida dubliniensis* dejan de crecer. ^{41,44,56}

Las pruebas de morfología colonial, la formación de clamidoconidios en agar Staib y en el Agar de Pal fueron de gran importancia debido a que se realizaron dos metodologías paralelas una colocando el cubreobjetos sobre las colonias con 48 horas de antelación y una segunda donde se colocaba una gota de azul de lactofenol y el cubreobjetos transcurridas las 48 horas de incubación.

Para la cepa ATCC de *Candida dubliniensis* así como para las dos cepas ATCC de *Candida albicans* se obtuvieron los resultados esperados. En el caso del crecimiento en el agar Staib *Candida dubliniensis* creció como colonias blancas y cremosas que presentaban a su alrededor un halo de pseudohifas que daban esa apariencia de “araña” a la colonia, al observar microscópicamente se observaron clamidoconidios en ambos cubreobjetos en el colocado 48 horas antes y en el que se colocó una gota de azul de algodón y el cubreobjetos transcurrido el tiempo de

incubación, cabe mencionar que no eran tan abundantes como sugeriría las características macroscópicas.

Las colonias de *Candida albicans* que crecieron en agar Staib poseían al igual que *Candida dubliniensis* colonia con aspecto cremoso con la diferencia de que estas colonias no presentaban ese halo característico que era evidente en las colonias de *Candida dubliniensis*. Al examen directo en el caso de las colonias donde se colocó la gota de azul de lactofenol se observaron únicamente blastoconidios en los campos analizados. Por otro lado en el cubreobjetos que se colocó 48 horas antes se observó algo muy distinto, ya que había formación de pseudofilamentos y presencia de blastoconidios esto se presentó en ambas cepas ATCC de *Candida albicans*.

En el caso de la morfología en el agar de Pal las características de las cepas ATCC fue muy similar, las colonias de *Candida dubliniensis* se desarrollaron como colonias rugosas con presencia de un halo de pseudofilamentos alrededor de las colonias y al examen microscópico se observó la presencia de pseudohifas así como la formación de algunos clamidoconidios esto se apreció nuevamente en ambos cubreobjetos.

La morfología de las cepas ATCC de *Candida albicans* en el agar de Pal fue la misma que la encontrada en el agar de Staib y se presentó el mismo fenómeno donde las colonias que se encontraban debajo del cubreobjetos por 48 horas desarrollaban pseudofilamentos pero no clamidoconidios.

De las 90 cepas de pacientes analizadas en este estudio solo 3 desarrollaron escasas pseudohifas alrededor de las colonias tanto en el agar de Pal como en el agar Staib al realizar el análisis microscópico de las mismas solo se hallaron pseudofilamentos y blastoconidios en ambos casos tanto para los cultivos con el cubreobjetos colocado 48 horas antes como el que tenía la gota de azul de lactofenol. Las demás cepas poseían una morfología similar a las cepas ATCC de *Candida albicans* es importante señalar que en estas cepas el mismo fenómeno

donde había diferencia entre el cubreobjetos colocado antes y el que se colocó en el momento fue observado.

Las diferencias en los resultados obtenidos entre las metodologías puede ser debido a los factores que se necesitan para la formación de las pseudohifas, como se sabe la formación de clamidoconidios está regulada por el estrés, al colocar el cubreobjetos con 48 horas de antelación se produce un microambiente donde la concentración de oxígeno es menor, provocando que el estrés para las células que se encuentran dentro de ese microambiente sea mayor y produzcan pseudohifas. Algunos autores reportan que después de 3 días dentro de este medio algunas cepas de *Candida albicans* también pueden llegar a presentar clamidoconidios por lo que es de vital importancia tener en cuenta los tiempos y las condiciones en las cuales se realiza el ensayo.

Las cepas de pacientes que se probaron en API ID 32 fueron identificadas como *Candida albicans* hay que considerar que en esta prueba la asimilación de la xilosa es una prueba para discernir entre las dos especies y que las especies sospechosa fueron capaces de asimilar dicho carbohidrato presentando crecimiento en esta cúpula.

Todos estos factores nos hacen pensar que la formación de pseudohifas observada en estas tres cepas en el agar Staib así como en el Agar de Pal se debió a que las cepas se encontraban estresadas por condiciones como al temperatura, las resiembras que se realizaron para mantener las cepas viables o bien algún tratamiento previo con agentes anti fúngicos en los pacientes que en ocasiones no se encuentra referido en la requisición y en este caso sería de importancia.

De las tres cepas que presentaron características similares a las de *Candida dubliniensis* la 11059 provenía de muestra de FRU de una tiña de los pies lo que puede sugerir que se trate en realidad de *Candida albicans* y haya sido el cambio de condiciones lo que estreso a la levadura y dio los resultados observados. Se tiene reportado un caso donde hubo un aislamiento de *Candida dubliniensis* uñas

de un paciente en la India. Para la identificación de esta solo usaron el desarrollo en agar Staib como prueba confirmatoria.

La cepa 11/17 por su parte provenía de un paciente con Fibrosis quística de una muestra de aspirado nasofaríngeo (ANF), Wahab reporta en un estudio realizado en estos pacientes que *Candida dubliniensis* fue la levadura predominante encontrada en vías respiratorias bajas y que al parecer se debe a una mayor capacidad de adherencia, que como se menciono previamente se presenta con el tratamiento con algunos azoles.

Así mismo la cepa 11/15 provenía de una paciente con Tumor de Willms de una secreción bronquial. Estos pacientes forman también parte de los grupos de riesgo de infección por *Candida* y que se encuentran comúnmente sujetos a tratamientos para evitar infecciones.

Con lo dicho anteriormente las cepas 11/15 y 11/17 se podrían tratar en realidad de *Candida dubliniensis* pero debido a los factores ya explicados presentaron características fenotípicas alteradas que pudieron llevarnos a la falsa identificación como *Candida albicans*, lo oportuno seria realizar algún estudio de biología molecular a estas dos cepas como PCR o bien espectrometría de masas (MALDI-TOF) para asegurar la identidad de las mismas.

11.- CONCLUSIONES.

De las 90 cepas probadas solo 3 de estas presentaron características parecidas a las de *Candida dubliniensis*, sin embargo al realizar la identificación con API ID 32 las cepas se clasificaron como *Candida albicans*. Las características de los pacientes, así como el origen de los materiales biológicos nos llevan a pensar que sería oportuno realizar alguna técnica de biología molecular a estas cepas.

Las pruebas de biología molecular siguen siendo el estándar de oro para la identificación de especies tan relacionadas como *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, sin embargo las pruebas fenotípicas existentes en conjunto con la historia clínica del paciente nos pueden orientar para identificar estas especies.

La diferenciación de estas dos especies es de gran importancia debido a las características propias de *Candida dubliniensis* como su capacidad de generar resistencia a los azoles, así como la de incrementar su adherencia a las células del huésped cuando *Candida albicans* generalmente presenta el fenómeno contrario.

Los tiempos así como las condiciones en las que se realizan las pruebas son de vital importancia para su interpretación como se pudo observar en la prueba de formación de pseudohifas y clamidoconidios donde se determinó que variando las condiciones se pueden observar resultados muy diferentes.

Se pueden realizar combinaciones de algunos de estos métodos con la finalidad de obtener mayor información, como usar medio cromogénico en conjunto con agar de Pal, o bien las pruebas de asimilación de Xilosa o desarrollo en medio hipertónico y el crecimiento a altas temperaturas. La correlación de las pruebas ayuda a una correcta identificación.

12.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. **Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals.** Microbiology. 1995 Jul;141 :1507-21.
2. Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D, McGowan KL. **Candida dubliniensis infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of Candida albicans.** J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):3354-7
- 3.- Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. **Retrospective identification and characterization 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 Jun;38(6):2423-6.
- 4.- Bradford K, Meinkoth J, McKeirnen K, Love B. **Candida peritonitis in dogs: report of 5 cases.** Vet Clin Pathol. 2013 Jun;42(2):227-33.
- 5.- Lamm CG, Grune SC, Estrada MM, McIlwain MB, Leutenegger CM. **Granulomatous rhinitis due to Candida parapsilosis in a cat.**J Vet Diagn Invest. 2013 Sep;25(5):596-8. doi: 10.1177/1040638713495388. Epub 2013 Jul 24.
- 6.- Nunn MA, Schaefer SM, Petrou MA, Brown JR. **Environmental source of Candida dubliniensis.** Emerg Infect Dis. 2007 May;13(5):747-50.
- 7.- Bonifaz A. **Micología médica básica.** 3ª. Edición, McGraw-Hill, México D.F., 2012.

- 8.- Amalia del Palacio, Julia Villar, Almudena Alhambra. **Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta**, Revista Iberoamericana de micología Vol. 26. Núm. 01. Marzo 2009 doi: 10.1016/S1130-1406(09)70002-6
- 9.- Domaneschi C, Massarente DB, de Freitas RS, de Sousa Marques HH, Paula CR, Migliari DA, Antunes JL. **Oral colonization by Candida species in AIDS pediatric patients**. Oral Dis. 2011 May;17(4):393-8.
- 10.- Pappu-Katikaneni LD, Rao KP, Banister E. **Gastrointestinal colonization with yeast species and Candida septicemia in very low birth weight infants**. Mycoses [1990, 33(1):20-23]
- 11.- Leli C, Mencacci A, Meucci M, Bietolini C, Vitali M, Farinelli S, D' Alò F, Bombaci JC, Perito S, Bistoni F. **Association of pregnancy and Candida vaginal colonization in women with or without symptoms of vulvovaginitis**. Minerva Ginecol. 2013 Jun;65(3):303-9.
- 12.- Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. **Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy Candida colonization during pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group**. Am J Obstet Gynecol. 1998 Feb;178(2):374-80.
- 13.- De la Rosa-García E, Miramontes-Zapata M, Sánchez-Vargas LO, Mondragón-Padilla A. **Oral colonisation and infection by Candida sp. in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis**. Nefrologia. 2013 Nov 13;33(6):764-70.
- 14.- Diamanti A, Capriati T, Iacono A. **Recurrent catheter related bloodstream infections by Candida glabrata: Successful treatment with taurolidine**. Clin Nutr. 2014 Apr;33(2):367.

15.- Mishra M, Agrawal S, Raut S, Kurhade AM, Powar RM. **Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patients.** J Clin Diagn Res. 2014 Feb;8(2):44-6.

16.- Güzel AB, Küçüköz-Güleç U, Aydın M, Gümral R, Kalkancı A, Ilkit M. **Candida vaginitis during contraceptive use: the influence of methods, antifungal susceptibility and virulence patterns.**J Obstet Gynaecol. 2013 Nov;33(8):850-6.

17.- Çalışkan S, Keçeli Özcan S, Cınar S, Corakçı A, Çalışkan E. **In vitro biofilm formation and relationship with antifungal resistance of Candida spp. isolated from vaginal and intrauterine device string samples of women with vaginal complaints.** Mikrobiyol Bul. 2011 Oct;45(4):697-706.

18.- Chassot F, Negri MF, Svidzinski AE, Donatti L, Peralta RM, Svidzinski TI, Consolaro ME. **Can intrauterine contraceptive devices be a Candida albicans reservoir?** Contraception. 2008 May;77(5):355-9.

19.- Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. **Biofilm formation of Candida albicans on implant overdenture materials and its removal.** 2012 Aug;40(8):686-92. doi: 10.1016/j.jdent.2012.04.026.

20.- Koba C, Koga C, Cho T, Kusukawa J. **Determination of Candida species nestled in denture fissures.** Biomed Rep. 2013 Jul;1(4):529-533. Epub 2013 May 22.

- 21.- Calcaterra R, Pasquantonio G, Vitali LA, Nicoletti M, Di Girolamo M, Mirisola C, Prena M, Condo R, Baggi L. **Occurrence of Candida species colonization in a population of denture-wearing immigrants.** Int J Immunopathol Pharmacol. 2013 Jan-Mar;26(1):239-46.
- 22.- Fölster-Holst R, Buchner M, Proksch E. **Diaper dermatitis.** Hautarzt. 2011 Sep;62(9):699-708; quiz 709. doi: 10.1007/s00105-011-2223-9.
- 23.- Pedro Diz Dios, Antonio Ocampo Hermida, Javier Fernández Feijoo, **Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos.** Medicina Oral 2002; 7: 206-21
- 24.- Janeth Navarrete M.Sc, Gladys Pinilla M.Sc, Liliana Muñoz L M.Sc, Ariel Ruiz A MD. **Fagocitosis en neonatos: determinación de valores normales para la micro técnica de fagocitosis y muerte intracelular de Candida Albicans.** Publicación Científica en ciencias biomédicas ISSN 1794 - 2470 vol. 10 No. 17 2012
- 25.- Mayer F., Wilson D., Hube B., **Candida albicans pathogenicity mechanism. Virulence.** Feb 15, 2013; 4(2): 119–128.
- 26.- Sudbery P, Gow N., Berman J., **The distinct morphogenic states of Candida albicans.** Trends in Microbiology.
- 27.- Si H., Hernday D., Matthew P., Johnson D., Bennett R., **Candida albicans White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth,** PLOS Pathogens Vol. 9, Tomo 3 Marzo 2013

- 28.- Fan Y, He H, Dong Y, Pan H. **Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and relevant signaling pathways in *Candida albicans***. Mycopathologia. 2013 Dec; 176(5-6):329-35. doi: 10.1007/s11046-013-9684-6. Epub 2013 Sep 4.
29. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. **A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation**. PLoS One 2011;
30. Verstrepen KJ, Klis FM. **Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts**. Mol Microbiol 2006; 60:5-15;
31. Zordan R, Cormack B. **Adhesins on Opportunistic Fungal Pathogens**. ASM Press, Washington,DC, pp 243-259, 2012.
32. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. **Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by hostcells**. PLoS Biol 2007;
33. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. **Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1**. Science 1999; 283:1535-8
34. Sundstrom P, Cutler JE, Staab JF. **Reevaluation of the role of *HWP1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus**. Infect Immun 2002; 70:3281-3
35. Sundstrom P. **Adhesion in *Candida* spp**. Cell Microbiol 2002; 4:461-9
36. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. **Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation**. Curr Biol 2008; 18:1017-24

37. Fanning S, Mitchell AP. **Fungal biofilms**. PLoS Pathog 2012; 8:e1002585; PMID:22496639
38. Finkel JS, Mitchell AP. **Genetic control of *Candida albicans* biofilm development**. Nat Rev Microbiol 2011; 9:109-18
39. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. **A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans***. Cell 2012; 148:126-38;
40. Xie Z, Thompson A, Sobue T, Kashleva H, Xu H, Vasilakos J, et al. ***Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing**. J Infect Dis 2012;
- 41 Sullivan DJ, Coleman DC. ***Candida dubliniensis*: Characteristics and identification**. J Clin Microbiol 1998; 36: 329-334.
- 42.- Staib P, Morschhäuser J. **Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme**. Mycoses. 2007 Jan;50(1):1-12..
- 43.- Odds FC, Bernaerts R. **CHROMagar *Candida* a new differential isolation médium for presumptive identification of clinically important *Candida* species**. J Clin Microbiol 1994; 32 1923-1929
- 44.- Sullivan DJ, Coleman DC, Pinjon E, Salkin I, Shanley D, Simple, Inexpensive, **Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans***. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36(7):2093.

- 45.- Staib P, Morschhäuser J. **Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis***. Mycoses 1999;42:521-4.
- 46.- Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Al-Sweih N, Chandy R. **Sunflower seed husk agar: A new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans***. Indian J Med Microbiol 2005;23:182-5.
- 47.- Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. **Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar**. J Clin Microbiol 2003;41:4787-9.
- 48.- Raut SH, Varaiya A. **Differentiation of *Candida dubliniensis* on chrom agar and Pal's agar**. Indian Journal of Medical Microbiology, (2009) 27(1): 55-8
- 49.- Coleman DC, Al Mosaid A., Sullivan D., **Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar** J. Clin. Microbiol. 2001, 39(1):323.
- 50.- Grillot R., Guarro J., Aldebert D., Ambroise-Thomas P., Cano J., Stevens D. A., and Sullivan D. J.. 2000. **Emerging pathogens**. Med. Mycol. 38(Suppl.):225-236.
51. Jabra-Rizk, MA.; Baqui, A.A.M.;Kelley, JI.: Falkler, W.A.; Merz, WC. y Meiller, T.F. **Identification of *Candida dubliniensis* in a Prospective Study of Patients in the United States**. Journal of Clinical Microbiology, 37: 321-326. 1999.
- 52 Pinjon E., Moran G.P., Coleman D.C. and Sullivan D.J. **Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis***, Biochemical Society Transactions (2005) Volume 33, part 5, 1210-1214

53.- Odds, F. C., L. Van Nuffel, and G. Dams. 1998. **Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection.** *J. Clin. Microbiol.* 36:2869-2873.

54.- Fotedar R, Al-Hedaithy SS (2003) ***Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia.** *J Clin Microbiol* 41: 1907–1911

55.- Moran, G.P., Sullivan, D.J., Henman, M.C., McCreary, C.E., Harrington, B.J., Shanley, D.B. and Coleman, D.C. **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

56.- Borg-Von Zepelin, M., Niederhaus, T., Gross, U., Seibold, M., Monod, M. and Tintelnot, K. **Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole.** *AIDS* 16, 1237–1244

57 Martinez, M., Lopez-Ribot, J.L., Kirkpatrick, W.R., Coco, B.J., Bachmann, S.P. and Patterson, T.F. **Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole.** *J. Clin. Microbiol.* 40, 3135–3139

58.- Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. **Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*.** *Rev Argent Microbiol* 2008;40: 211-217

59.- Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V: **Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems.** *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3533–3539.

60.- Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E, Rodriguez J: **Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates.** J Clin Microbiol 2003; 41: 489–491.

61.- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR: **Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -methyl- D -glucoside as determined with API 20C AUX and Vitek YBC systems.** J Clin Microbiol 1999; 37: 3804–3808.

62.- Ziauddin Khan, Suhail Ahmad, Rachel Chandy, Leena Joseph **A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*,** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 72 (2012) 285–287

63.- Bikandi,J.; San Millán, R.; Moragues, M.; Cebas, G.; Clarke, M; Coleman, D.C.;Sullivan, D.J.; Quindós, G. y Pontón1, J. **Rapid Identification of *Candida dubliniensis* by Indirect Immunofluorescence Based on Differential Localization of Antigens on *C. dubliniensis* Blastospores and *Candida albicans* Germ Tubes.** Journal of Clinical Microbiology. 36: 2428-2433. 1998.

64 Girish K. Thangam M. **Tobacco agar: a new medium for chlamydosporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*** Medical Mycology August 2005, 43, 473- 475

65.- Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, et al . **Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.** J Clin Microbiol 2003; 41: 1259-1262.

66.- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. **Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of**

DNasequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNAgenes. J Clin Microbiol. 2000;38:2302–10.

67.- Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. **Identification ofmedically important yeast species by sequence analysis of the internal transcri-bed spacer regions.** J Clin Microbiol. 2006;44:693–9.

68.- Garner CD, Starr JK, McDonough PL, Altier C. **Molecular identification of veteri-nary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit.** J Clin Microbiol. 2010;48:2140–6.

69.- Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. **Molecular identification of closely related Candida species using two ribosomal intergenicspacer fingerprinting methods.** J Mol Diagn. 2011;13:12–22.19

70.- Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. **La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica.** Enferm Infecc Microbiol Clin.2012; 30:635–44.20.

71.- Fátima Galána, Lidia García-Agudob, Inmaculada Guerreroa, Pilar Marína, Ana García-Tapiaa, Pedro García-Martosa,* y Manuel Rodríguez-Iglesias **Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;

72.- Brown, D. M., M. A. Jabra-Rizk, W. A. Falkler, Jr, A. A. Baqui, and T. F. Meiller. 2000. **Identification of Candida dubliniensis in a study of HIVseropositive pediatric dental patients.** Pediatr. Dent. 22:234–238.

73.- Cimolai, N., J. Davis, and C. Trombley. 2002. **Candida dubliniensis fungemia and vascular access infection.** J. Pediatr. Hematol. Oncol. 24:237–239.

74.- Meis, J., M. Ruhnke, B. De Pauw, F. Odds, W. Seigert, and P. Verweij. 1999. ***Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation.** Emerg. Infect. Dis. 5:150–153.

75.- Sebti, A., T. E. Kiehn, D. Perlin, V. Chaturvedi, M. Wong, A. Doney, S. Park, and K. A. Sepkowitz. 2001. ***Candida dubliniensis* at a cancer center.** Clin. Infect Dis. 32:1034–1038.

12.-ANEXO

Tabla 5. Datos obtenidos de los pacientes de los que se obtuvieron las cepas.

No. Cepa	No Micológico	Servicio	Cama	Muestra	Edad	Sexo	Diagnostico	No. registro
1	01/13	Infectología	461	Orina	1 año	M	Fiebre sin foco	442209
2	02/33	Cirugía	252	Orina	8 años	M	no referido	445912
3	12/26	Oncología	210	Secreción	11 años	M	Absceso abdominal	450342
4	11059	Dermatología	EXT	Escamas piel	14 años	m	Tiña de los pies	440822
5	01/36	Cardiología	234	Orina	2 años	M	no referido	478943
6	01/37	UTIP	280	AB	6 años	M	Neumonía	482645
7	01103	Neonatología	352	orina	27 días	M	Encefalitis	482361
8	11061	Neumología	EXT	ANF	10 años	M	Asma	460045
9	11/32	UCICV	288	Aspirado Traqueal	Sin dato	M	Neumología	481415
10	01008	Hematología	315	Cavidad Oral	3 años	M	Hemofilia A	481460
11	01/18]Neonatología	352	AB	15 días	M	Neumonía	482361
12	01/33	UTIP	280	AB	6 años	M	Neumonía	482645
13	01/02	Infectología	Sin dato	esputo	Sin dato	M	no referido	468474

14	01/03	Neonatología	351	AB	RN	F	neumonía	482393
15	01/25	Hematología	314	orina	3 años	F	IVU	Sin dato
16	01/30	Neumología	Sin dato	ANF	Sin Dato	F	FQ	454078
17	01/09	Cirugía	253	Secreción absceso	11 años	M	Linfoma	450342
18	11021	Neumología	EXT	AB	6 años	M	no referido	473994
19	01119	Neonatología	352	Orina	29 días	M	Encefalitis	482361
20	08/20	UTIP	280	Orina	3 meses	M	no referido	485370
21	08/21	UTIP	280	Orina	3 meses	M	Sepsis s/foco	485371
22	08/08	UTIP	280	Orina	2 meses	M	Fiebre S/foco	485370
23	08134	Neumología	269	AB	3 años	M	Mucormicosis	481489
24	08097	UTIP	285	Secreción	4 años	M	Mucormicosis	481489
25	08/15	UTIP	280	Orina	2 meses	M	IVU	485370
26	09069	Neurología	106	Orina	1.5 años	M	Infección hongos	483587
27	08/16	Hospitalización	EXT	Aspirado Faríngeo	Sin dato	F	no referido	Sin dato
28	09053	Neonatología	350	Orina	63 días	F	NEUMONIA	485257
29	07/10	Infectología	423	Sangre	4 años	M	Ventriculitis	484553
30	09/14	Neurología	101	Orina	3 años	M	IVU	4675556
31	08130	Neumología	235	ANF	7 años	F	FQ	454078

32	09015	Urgencias	2	CB	17 años	M	DM	416641
33	07/16	Infectología	423	Sangre	5 meses	M	Ventriculitis	484553
34	09/06	Infectología	454	Orina	3 años	M	no referido	469024
35	09/09	nefrología	EXT	Orina	13 años	M	TR	485065
36	09080	Infectología	470	Orina	3 años 9 meses	F	LAL	479715
37	09040	neonatología	350	Orina	62 días	F	Neumonía	485257
38	08107	Neumología	EXT	ANF	8 años	F	FQ	455826
39	08123	Neumología	235	LBA	7 años	F	FQ	454078
40	07/09	Infectología	466	Orina	17 años	F	IVU	414365
41	10123 (2)	Nefrología	EXT	Secreción Vaginal	3.5 años	F	Trasplante Renal	457606
42	10138	Otorrino	219	Escamas	14 años	M	Tinea Capitis	481180
43	10143	Inmunología	306	CB	5 años	F	LES	481368
44	10146 (2)	Infectología	466	Orina	6 meses	M	Diagnostico Conocido	481477
45	10/46	UTIP	287	Orina	15 años	M	Post Operación Cierre Auricular	385864
46	10/52	Neumología	235	ANF	14 años	F	FQ	424809
47	10/57	Infectología	464	Orina	12 años	F	Acidemia	408373
48	10/59	Urgencias	9	Secreción	12 años	M	CC	477585

				Bronquial				
49	11/01	Inmunología	306	Orina	9 años	F	LES	481368
50	11/06	Neumología	SD	ANF	16 años	M	FQ	450145
51	11/07	Neumología	235	ANF	18 años	F	FQ	424803
52	11/08	Neumología	238	Secreción Traqueal	1año	F	Traquendobronquitis	480779
53	11/10	Neumología	EXT	ANF	7 años	F	FQ	455826
54	11/11	Neumología	EXT	ANF	6 años	M	Neumopatía	477583
55	11/14	Infectología	406	Orina	6 años	M	Diagnostico Conocido	481477
56	11/15	UTIP	273	Secreción Bronquial	2 años	F	Tumor de Willms	480537
57	11/17	Neumología	EXT	ANF	6 años	F	FQ	454078
58	11/18	Neumología	SD	ANF	11años	F	no referido	408407
59	11/26	Neumología	EXT	ANF	18 años	F	FQ	362973
60	11/27	Neumología	235	ANF	6 años	F	FQ	424809
61	11/30	Infectología	436	Orina	6 meses	M	Neumonía	478763
62	11/31	Infectología	445	Orina	1 mes	F	Pielonefritis	481158
63	11/33	Neumología	289	A. Bronquial	6 meses	M	Endobronquitis	480617
64	11/34	Neumología	288	A. Bronquial	Sin dato	M	SD	481415
65	11/36	Neumología	EXT	ANF	16 años	M	FQ	420701

66	11/35	UCICV	289	Secreción Bronquial	6 meses	M	Neumonía	480617
67	11/38	Sin dato	477	Secreción eritema	10 meses	F	no referido	477790
68	12/25	Oncología	337	Sangre	4 años	F	Sepsis	469298
69	12/28	Oncología	337	Sangre	4 años	F	Glioblastoma	469298
70	12/34	Quirófano	253	Sangre	11 años	M	Linfoma	450342
71	12050	UCICV	287	Orina	6 meses	M	Insuficiencia cardiaca	478943
72	12079	Cardiología	230	Orina	7 meses	M	Insuficiencia cardiaca	478943
73	01/07	Infectología	432	Orina	14 años	F	Lam	470782
74	01/10	Cirugía	233	Absceso Hepático	11 años	M	Absceso Hepático	450342
75	01/12	Urgencias	EXT	Secreción Bronquial	Sin dato	M	no referido	482426
76	01/17	Neumología	EXT	ANF	8 años	M	FQ	451767
77	01/23	Cirugía	253	Orina	2 años	F	IVU	482493
78	01/31	Neonatología	386	Aspirado bronquial	3 meses	F	no referido	481407
79	01/34	Inmunología	EXT	ANF	Sin dato	F	no referido	482296
80	01019	Urgencias	2	Orina	5 años	F	Colitis neutropenica	480095

81	01032	Infectología	432	Orina	14 años	F	Neutropenia	470782
82	01052	Infectología	461	Orina	11 meses	M	no referido	482209
83	01055	Neumología	EXT	ANF	12 años	F	FQ	455149
84	01088	Infectología	424	Orina	3 meses	F	Osteomielitis	481481
85	01102	Inmunología	223	Cavidad oral	9 meses	F	Neutropenia	482718
86	01106	Infectología	424	Orina	3 meses	F	Panosteomielitis	481481
87	01/09	Cirugía	253	Secreción absceso	11 años	M	Linfoma	450342
88	01/22	Urgencias	8	Orina	1 mes	M	I.V.U.	482586
89	01047	Infectología	Sin dato	Orina	14 años	F	LAM	470782
90	01114	Infectología	Sin dato	Orina	3 meses	F	Panosteomielitis	481481

Material.

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Tubos de ensaye 12 x 75
- Tubos de ensaye 16 x 150
- Pinzas
- Alcohol
- Gradillas metálicas
- Mataraces Erlenmeyer de 500 mL y 1000mL
- Embudo
- Gasas
- Papel Filtro

Equipo.

- Estufa 37 °C
- Estufa 45 °C
- Balanza granataria
- Incubadora 28°C
- Microscopio óptico
- Refrigerador
- Centrifuga

Reactivos

- KOH 20%
- Azul de Lactofenol
- Estandar de McFarland 2.0

- Cepas ATCC
 - *Candida albicans* 66028
 - *Candida albicans* 90028
 - *Candida dubliniensis* CD 36

Medios de cultivo

Agar Sabouraud dextrosa modificado Emmons (SDA)

Formula

Digerido pancreático de caseína	5.00g
Digerido pancreático de tejido animal	5.00g
Dextrosa	40.00g
Agar	15.00g
Agua destilada	1000mL

CHROMagar Candida Medium

Formula

Cromopectona	10.00g
Mezcla cromogénica	2.00g
Dextrosa	20.00g
Agar	15.00g
Cloranfenicol	500mg
Agua destilada	1000mL

Agar Staib.

El agar Staib se preparó pesando 50 g de semillas de alpiste negro y licuándolas, para posteriormente ponerlas a hervir en un 1L de agua destilada. Se puso a hervir durante treinta minutos y se dejó enfriar. Se filtró dos veces y se agregó 1g de glucosa, 1 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y 1 g de creatinina, se ajusta el volumen a 1 L y el pH a 5.5. Agregar 15 g de agar. Esterilizar a 110 °C durante 20 minutos. Se vertió en cajas Petri desechables

Agar de Pal.

El agar Pal se preparó pesando 50 g de semillas de girasol con cascara y licuándolas finamente, para posteriormente ponerlas a hervir en un 1L de agua destilada. Se puso a hervir durante treinta minutos y se dejó enfriar. Se filtró dos veces y se agregó 1g de glucosa, 1 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y 1 g de creatinina, se ajusta el volumen a 1 L y el pH a 5.5. Agregar 15 g de agar. Esterilizar a 110 °C durante 20 minutos. Se vertió en cajas Petri desechables.