



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**Métodos bioquímicos y morfológicos
para la diferenciación entre
Candida albicans Y *Candida dubliniensis***

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

OSORNIO CARMONA ITZEL ANAHÍ

Asesores

Dr. Enrique Salas Téllez

Dra. Alma Lucila Núñez del Arco

Cuautitlán Izcalli, Edo de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza a la alumna:
Itzel Anahí Osornio Carmona
Con número de cuenta: 307206161 a presentar el: **Trabajo de Tesis.**

Métodos bioquímicos y morfológicos para la diferenciación entre Candida albicans y Candida dubliniensis.

Bajo la asesoría de la: Dr. Enrique Salas Téllez
Para obtener el título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA	FECHA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>		<u>27-Oct-17</u>
VOCAL	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>		<u>27 oct 17</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo</u>		<u>23 oct 17</u>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio</u>		<u>23 oct 17</u>
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero</u>		<u>23/oct/17</u>

Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 15 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO. Si existieran correcciones u observaciones en el trabajo, contaría con 15 días hábiles más a partir del momento en que el pasante entrega el trabajo corregido, para emitir su VOTO APROBATORIO o RECHAZO, todo esto de acuerdo al artículo 21 del Reglamento de Exámenes Profesionales.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2017.

I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
JEFA DEL DEPARTAMENTO

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

El presente trabajo esta dedicado a quienes han estado conmigo en este largo proceso, a quienes han sido pacientes y han seguido apoyándome y confiando en mi a pesar del tiempo.

A mi familia (Jorge, Cris, Cynthia, Danna y Emiliano), simplemente gracias por su amor y por estar a mi lado en mis momentos más oscuros.

Isaac gracias por nunca soltarme, por tomarme de la mano y caminar junto a mi aún en las tinieblas.

A mis asesores (Dr. Enrique y Dra. Alma), a quienes aprecio, gracias por su paciencia, por sus consejos, por depositar su confianza en mi y sobre todo gracias por compartir conmigo gran parte de su conocimiento.

Finalmente, gracias a mi hermosa Isabella por inspirarme a ser una mejor persona.

Te amo bebé

ÍNDICE

	PÁGINAS
Índice de tablas	5
Índice de figuras	5
Índice de gráficas	5
Índice de diagramas	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	8
1.0 Características del género <i>Candida</i>	
1.1 Candidiasis	
1.2 Consideraciones diagnosticas <i>Candida dubliniensis</i>	
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
HIPÓTESIS	21
METODOLOGÍA	22
A. Recolección e identificación de las muestras	
B. Evaluación del crecimiento a 42°C	
C. Producción de clamidoconidias	
D. Crecimiento en agar Sabouraud-trifeniltetrazolio	
E. Asimilación de los compuestos de carbono	
F. Pruebas de biología molecular	
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	47
ANEXOS	48
REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Clasificación de los tipos de Candidiasis	10
2	Factores de riesgo para el desarrollo de la infección por <i>Candida spp.</i>	11
3	Frecuencia de infección por especies patógenas de <i>Candida</i>	12
4	Especies de <i>Candida</i> y factores predisponentes para la infección	13
5	Perfiles bioquímicos API 20C AUX bioMerieux para <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	26
6	Identificación de las muestras provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla	29
7	Perfiles bioquímicos API 20C AUX bioMerieux a las 72 hrs	39

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Distribución de las especies más frecuentes de <i>Candida</i> diferentes de <i>Candida albicans</i>	14
2	Colores obtenidos por cepas con diagnóstico presuntivo de <i>C. albicans</i> en CHROMagar <i>Candida</i>	22
3	Morfología de las clamidoconidias de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	24
4	Resultados obtenidos en agar SDA con TTZ según la literatura	25
5	<i>Candida albicans</i> ATCC 32354 en agar semilla de girasol	34
6	<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 178 en agar semilla de girasol	34
7	Microvesícula en agar semilla de girasol	36
8	Clamidoconidias de <i>Candida albicans</i> ATCC 32354	36
9	Clamidoconidias de <i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA178	37
10	Muestra L17-21-15 en SDA con TTZ	37
11	Colonias en agar SDA con TTZ de ambas cepas de referencia	38
12	Reacción de reducción de TTZ a formazán	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona bacteriológica	32
2	Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona de carne	33
3	Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona de caseína	33
4	Porcentaje de la abundancia de clamidoconidias producidas en agar semilla de Girasol con glucosa	35
5	Porcentaje de la abundancia de clamidoconidias producidas en agar semilla de Girasol sin glucosa	31

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Metodología general del estudio	24

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se realizaron diversas pruebas bioquímicas y morfológicas a un total de 102 muestras clínicas provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla, todas ellas con diagnóstico presuntivo de *Candida spp.*, con el objetivo de identificar y diferenciar cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, utilizando como referencia dos cepas ATCC, *C. albicans* 32354 y *C. dubliniensis* MYA178.

Los resultados de las pruebas bioquímicas y morfológicas revelan diferencias en 19 de las 102 muestras clínicas, indicando la posible presencia de *Candida dubliniensis*. Con la finalidad de corroborar la identificación, se les realizaron pruebas de biología molecular (PCR), a las 19 muestras resultando ser *Candida albicans*.

Concluyendo así, que, aunque la literatura indica la existencia de pruebas morfológicas y bioquímicas para la discriminación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, dichas pruebas no resultan ser contundentes, y se requiere de la biología molecular para poder diferenciar entre ambas especies.

INTRODUCCIÓN

Aunque *Candida albicans* es responsable de la mayoría de las infecciones por hongos en los seres humanos, su filogenia sufrió cambios importantes debido al reconocimiento de una nueva especie patógena estrechamente relacionada llamada *Candida dubliniensis*. El descubrimiento de esta nueva especie ha tenido consecuencias importantes de diagnóstico puesto que, como *Candida albicans*, produce clamidoconidias y tubos germinales, debido a lo cual todavía puede ser identificada erróneamente como tal mediante métodos de identificación convencionales. (Criseo, 2015)

Las técnicas moleculares de identificación son consideradas las más específicas para diferenciar estas especies; sin embargo, se siguen necesitando métodos precisos, rápidos y de bajo costo para ser utilizados en laboratorios de micología de baja complejidad. (Criseo, 2015)

MARCO TEÓRICO

La incidencia de las infecciones fúngicas se ha incrementado de manera espectacular en todo el mundo en los últimos años debido a un aumento continuo de las condiciones inmunosupresoras como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros factores predisponentes, incluyendo el trasplante de órganos, pacientes con cáncer que reciben tratamiento con quimioterapia, el uso de antibióticos de amplio espectro, pacientes críticos con catéteres intravasculares, la diabetes y el uso indebido de drogas por vía intravenosa. (Miceli, 2011)

Aunque la infección por VIH ha sido considerado un factor importante en el aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas, es sola es una de las muchas razones que han contribuido al cambio. Los acontecimientos que han desempeñado un papel importante en el aumento en la frecuencia de las micosis incluyen la relativa facilidad de los viajes internacionales, la expansión y el envejecimiento de la población, una ruptura en las medidas de salud pública, el aumento en las tasas de inmigración y la prolongación de la vida debido a los avances médicos. Las levaduras son el agente causal principal de las enfermedades por hongos, especialmente *Candida spp.* (Cooper, 2011)

1. Características del género *Candida*

Los miembros del género *Candida* son levaduras pertenecientes a la familia *Cryptococcaceae*; las células pueden tener diferentes formas globosas, elipsoidales, cilíndricas o alargadas y ocasionalmente ojivales, triangulares o semilunares; pequeñas de entre 2-6 μm . Se reproducen mediante gemación holoblástica. Son ubicuos en el medio ambiente; siendo así que las diversas condiciones de los hábitats donde se encuentran determinan la amplia gama de propiedades fisiológicas. Algunas especies son dimórficas, lo que significa que pueden cambiar de su fase unicelular a la de pseudohifa o hifa verdadera. *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*, además de presentar forma de levadura y de pseudohifas, pueden formar hifas verdaderas. *C. glabrata* siempre presenta forma de levadura; *C. krusei* y *C. parapsilosis* son microorganismos dimórficos, que pueden presentar forma de levadura o de pseudohifa. En el tejido infectado todas las especies, excepto *C. glabrata*, pueden presentar forma de levadura o filamentosa. La mayoría de las especies de *Candida* son mesófilicas, crecen bien en temperaturas entre los 25-30°C. Las colonias de *Candida* son cremosas amarillentas, de rápido crecimiento y maduración de tres días. La textura de las colonias puede ser pastosa, suave, brillante o seca, rugosa o lisa, dependiendo la especie. (Barnett, 2014; Hommel, 2014)

Candida es un género filogenéticamente heterogéneo del cual se han descrito cientos de especies, las cuales en circunstancias normales, son microorganismos comensales no patógenos en humanos. Sin embargo, son los hongos patógenos oportunistas predominantes, y pueden causar infecciones superficiales o invasivas, que se asocian con una morbilidad y mortalidad significativas. (Criseo, 2015; Wang, 2016)

1.1 Candidiasis

El término Candidiasis comprende un espectro clínico extremadamente variado desde una infección superficial hasta una diseminada, y puede afectar cualquier órgano o sistema (Tabla 1). A la candidiasis superficial a menudo se le asocia con desnutrición, embarazo y enfermedades con trastornos del sistema inmunitario (por ejemplo, diabetes). Por otro lado, la candidiasis profunda o sistémica, incluyendo dos o más órganos, es con frecuencia iatrogénica como resultado de hiperalimentación parenteral, antibióticos de amplio espectro, inmunosupresor, o terapias antineoplásicas. (Bonifaz, 2010)

Tabla 1. Clasificación de los tipos de Candidiasis.

CANDIDIASIS	TIPO CLINICO	CARACTERÍSTICAS	CUADRO CLÍNICO
MUCOCUTÁNEA	Oral	Es frecuente en niños recién nacidos, se obtiene por un fuerte inoculo en el parto, generalmente la madre cursaba con candidiasis vaginal.	Placas blancas en cavidad bucal y lengua presentando dolor y ardor.
	Genital A) Vaginitis B) Balanitis	A) Es la infección más frecuente en el aparato genital femenino, se presenta generalmente en edad reproductiva. B) Generalmente se adquieren por relación sexual con pareja en curso de vaginitis por <i>Candida</i> .	A) Se presenta un exudado blanquecino (leucorrea) espeso, las mucosas se encuentran eritematosas y con presencia de prurito y ardor vulvar. B) La balanitis es superficial presentando eritema, micro pústulas y erosiones en el glande y surco prepucial.
	Gastrointestinal A) Esofagitis B) Peritonitis	A) Es secundaria a una candidiasis oral con una abundante colonización de la flora en intestino.	A) Se observan placas blancas similares a la oral, presentando fatiga, náuseas y vomito. B) Diarreas con evacuaciones mucoso-blanquecinas, hay dolor abdominal y meteorismo.
	Respiratoria A) Pulmonar	A) Se presenta en pacientes inmunocomprometidos o con fibrosis quística, regularmente es una entidad crónica.	A) Tos con expectoración mucoides y a veces sanguinolenta, dolor torácico, disnea y esputo blanquecino, puede afectar uno o ambos pulmones, con posible derrame pleural.
CUTÁNEA	Intertrigos	Es menos frecuente que los mucocutáneos, este se presenta en axilas, ángulo interno del muslo y en los pliegues de la piel.	En estos casos aparecen placas eritematoescamosas con borde eritematoso, los pacientes refieren prurito intenso.
	Onicomycosis A) con Perionixis B) con Onicosis	A) Es la forma más común (70%) y a diferencia de las tiñas se presenta en el borde proximal y con inflamación, es más frecuente en uñas de manos. B) Es la segunda variedad y menos frecuente (30%) el cual se caracteriza por el desprendimiento de la uña.	A) Se observa una periferia eritematosa, la uña se puede tornar oscura y se deforma, los pacientes refieren poco prurito y dolor al tacto. B) La uña se observa opaca y estriada antes de perderla.
	Granuloma	Es muy rara y se observa en niños con severos problemas en la inmunidad celular y en adultos con diabetes mellitus descompensada.	Las lesiones se presentan en cualquier lugar de la piel observándose lesiones verrucosas que ulceran.
SISTÉMICA	Meningitis	Es una micosis rara y secundaria a la diseminación a partir de los sitios de infección.	Es similar a la meningitis bacteriana con intensa cefalea, rigidez en la nuca, fiebre intermitente y se puede llegar a estado de coma.
	Septicemia	Se presenta en pacientes severamente inmunocomprometidos	Su sintomatología es variable con fiebre y escalofríos, se confunde con septicemias bacterianas.

(Bonifaz, 2010)

La principal fuente de infección del humano es endógena; en el caso de *C. albicans*, en circunstancias relacionadas con la pérdida del balance de la microbiota o con el compromiso de las defensas inmunes, cuando aumenta la población de levaduras, ocurre una sobre colonización y posteriormente la invasión. Las fuentes de infección exógenas son las manos del personal médico o paramédico, al nacer o con material contaminado como soluciones parenterales, soluciones oftálmicas después de una cirugía, dispositivos médicos como catéteres, válvulas cardíacas y respiratorias, entre otros. El estado inmune del hospedero es el factor más importante para que *Candida spp.* se transforme en patógeno (Tabla 2). Por ello es considerada como el oportunista por excelencia. Los factores de virulencia que determinan su relación con el hospedero (patogenia) son numerosos; entre ellos que cuenta con la capacidad de adherirse a los tejidos o a superficies de catéteres o prótesis, lo cual le permite colonizar estas superficies. Además, tiene la capacidad de formar biopelículas que las hacen menos vulnerables a la acción de los antimicóticos, debido a que la matriz extracelular excluye o limita el acceso a éstos. En estas formaciones también hay disminución del metabolismo o crecimiento del hongo, lo cual disminuye los sitios de acción de la mayoría de los antimicóticos. Igualmente se relaciona con aumento de genes de resistencia presentes en las levaduras en dichas biopelículas. Otros factores que la ayudan a invadir y diseminarse por los tejidos son la capacidad de producir enzimas (proteasas, fosfolipasas y lipasas) y el cambio morfológico de levadura a blastoconidia o filamento. (De Bedout, 2010; Figueras, 2011; Oliva, 2013)

Tabla 2. Factores de riesgo para el desarrollo de la infección por *Candida spp.*

FACTOR DE RIESGO	CAUSA
Edad	Neonatos y lactantes Dado que la microflora y la inmunidad local que limitan su crecimiento están insuficientemente desarrollados
Cambios fisiológicos	Embarazo Disfunciones endocrinas o administración de esteroides
Antibióterrapia	Alteración de la microflora habitual
Nutrición	Hipovitaminosis o hiperglucemia Favorecen el crecimiento fúngico y disminuyen la capacidad defensiva del huésped al alterar la regulación de los genes de adhesión a proteínas y la capacidad del complemento para la opsonización
Rotura física de las barreras protectoras naturales del organismo	Quemaduras, heridas, uso de dispositivos externos como catéteres vasculares y peritoneales, prótesis vasculares o cualquier material que se coloque en el músculo, piel, torrente sanguíneo o sistema nervioso central, nutrición parenteral, cirugía mayor abdominal
Alteración de la inmunidad	Pacientes inmunodeprimidos por quimioterapia citotóxica o sometidos a trasplante de órgano sólido o de médula ósea, neutropenia, diabetes, corticoterapia

(Basado en Figueras, 2011)

C. albicans es la especie causante de la mayoría de las infecciones, tanto superficiales como sistémicas; por lo tanto es la especie que se aísla con mayor frecuencia de muestras clínicas. Es la única que coloniza en condiciones normales la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina, adhiriéndose a las células epiteliales. Es un patógeno ubicuo en la mayoría de los animales de sangre caliente como las aves, cerdos, vacas, perros, algunos primates y animales salvajes. Aproximadamente del 40-60% de la población adulta humana alberga a esta levadura. Se puede considerar como un comensal obligado, inofensivo y a menudo asintomático. En las últimas décadas, la incidencia de las infecciones por *C. albicans* ha decaído mientras que la incidencia de especies de *Candida no albicans* ha incrementado en todo el mundo, incluyendo a *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Tabla 3). (Figueras, 2011; Hommel, 2014; Oliva, 2013; Polke, 2015; Pozzatti, 2010)

Tabla 3. Frecuencia de infección por especies patógenas de *Candida*

ESPECIE	FRECUENCIA
<i>Candida albicans</i>	<50%
<i>Candida tropicalis</i>	15-30%
<i>Candida parapsilosis</i>	15-30%
<i>Candida glabrata</i>	15-30%
<i>Candida krusei</i>	>1%
<i>Candida guilliermondi</i>	>1%
<i>Candida dubliniensis</i>	>1%

(Castañón, 2012)

Algunas de dichas especies se han asociado con ciertos grupos de riesgo que sugieren que su colonización y sus estrategias de supervivencia promueven infecciones solo en circunstancias preliminares distintas (Tabla 4). (Figueras, 2011)

Entre estas especies, *Candida glabrata*, ha surgido como uno de los patógenos oportunistas más importantes capaz de infectar una gran variedad de sitios del cuerpo humano, predomina en los ancianos, trasplantados de órganos sólidos y pacientes con cáncer. La profilaxis con fluconazol es un factor predisponente. Tiene una alta incidencia en América del Norte y Europa Central, mientras que en Latinoamérica esta especie tiene una baja incidencia (4-6%). *C. tropicalis* es considerada una causa importante de candidiasis invasiva en pacientes con cáncer, especialmente con leucemia, neutropenia y en trasplante de células madre. Se ha observado disminución de Candidemia por esta

especie con el uso profiláctico de fluconazol en pacientes con cáncer. Comúnmente aislada en el sur de América y Asia, con una incidencia de Candidemia mayor al 15%. (Criseo, 2015; De Bedout, 2010; Miceli, 2011; Muadcheingka, 2015)

Tabla 4. Especies de *Candida* y factores predisponentes para la infección

ESPECIE	FACTOR PREDISPONENTE
<i>Candida albicans</i>	Unidades de cuidados intensivos, catéteres intravasculares centrales, tratamiento antibiótico o corticoide, cirugía
<i>Candida parapsilosis</i>	Prematuridad, catéteres intravasculares, nutrición parenteral
<i>Candida tropicalis</i>	Inmunodepresión, enfermedades neoplásicas
<i>Candida glabrata</i>	Tratamiento previo con fluconazol, inmunodepresión grave
<i>Candida krusei</i>	Tratamiento previo con fluconazol, inmunodepresión, enfermedades neoplásicas

(Figueras, 2011)

Por otra parte, *Candida parapsilosis* es considerado un patógeno exógeno y se encuentra como colonizador transitorio de piel-uñas y, ocasionalmente, de mucosas. Se asocia a infecciones adquiridas a través de las manos y de los ambientes hospitalarios e, igualmente, también con nutrición parenteral, en cirugías recientes que requieren catéteres intravenosos y uso de caspofungina en pacientes con trasplante de células madre. Es un patógeno importante en la infección del torrente sanguíneo en neonatos, especialmente en pacientes prematuros y de bajo peso al nacer, representa a menudo la segunda especie de *Candida* más comúnmente aislada de cultivos de sangre en muchas áreas del mundo, especialmente en los países de América del Sur y Europa y los países mediterráneos de África. *C. krusei* es una especie considerada emergente debido al uso profiláctico con fluconazol, al igual que *C. tropicalis* está asociada a pacientes con neutropenia. La colonización por esta especie es un predictor de candidemia. Se trata de un microorganismo multiresistente a los antimicóticos debido a que tiene una resistencia intrínseca al fluconazol, una susceptibilidad disminuida a la anfotericina y la flucitocina que esta además, asociada a la alta mortalidad (40-80%). *C. dubliniensis* es un patógeno oportunista que se asocia con candidiasis oral e infecciones invasivas especialmente en

pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. Este raro patógeno ha sido reportado como causante de infección en humanos en Australia, Europa y Argentina. La prevalencia de *C. dubliniensis* como agente causal de candidemia es de 0.96% en Argentina, aproximadamente del 2% en Estados Unidos y el Reino Unido (Figura 1). Otras especies como *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida guilliermondii*, y *Candida famata* rara vez se encuentran en muestras clínicas, aunque ha habido varios informes de casos clínicos que describen las infecciones causadas por estas especies de *Candida* no comunes. (Criseo, 2015; De Bedout, 2010; Miceli, 2011; Muadcheingka, 2015)



Figura 1. Distribución de las especies más frecuentes de *Candida* diferentes de *Candida albicans* (en el caso de *Candida dubliniensis* las áreas representan los lugares con reporte de más del 2% aislados de sangre). (Quindós, 2014)

Sin embargo, la lista de nuevas especies patógenas de *Candida* continúa creciendo ya que el estudio tradicional de las levaduras clínicamente relevantes ha sido profundamente influenciada por el desarrollo de una amplia gama de técnicas moleculares, incluyendo las tecnologías de secuenciación, que combinadas con las herramientas bioinformáticas han permitido a los investigadores entender mejor la biodiversidad, la sistemática y la evolución de los hongos patógenos. Por lo tanto varias cepas atípicas de *Candida*,

tradicionalmente mal identificados en los laboratorios clínicos, ahora se conocen como importantes patógenos de interés médico. (Criseo, 2015)

1.2 Consideraciones diagnósticas

El diagnóstico de las enfermedades fúngicas emergentes depende en su mayoría del cultivo microbiológico tradicional, los métodos de identificación fenotípica que incluye medios cromogénicos, la asimilación de carbohidratos y la histopatología. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales para la detección de las infecciones fúngicas, se han desarrollado nuevos métodos. Estos métodos incluyen sistemas de detección del antígeno, como son ELISA y PCR, una amplia gama de técnicas novedosas que incluyen ensayos moleculares, espectrometría de masas MALDI-TOF y técnicas de aglutinación basadas en anticuerpos específicos. Una combinación de estos métodos aumenta considerablemente la probabilidad de una identificación fiable de *Candida* a nivel de género y especie. Sin embargo, estas técnicas necesitan ser evaluadas en grandes grupos de pacientes y no están estandarizados en la actualidad. (Pasligh, 2010; Razzaghi-Abyaneh, 2014)

El diagnóstico definitivo de estas infecciones no solo es importante desde el punto de vista epidemiológico, también lo es debido a que las especies relacionadas difieren en la susceptibilidad a los diferentes agentes antifúngicos. La dramática aparición de la resistencia a múltiples fármacos instó a los científicos para determinar los patrones de susceptibilidad de este patógeno comensal de humanos y animales. De esta manera, el aislamiento y la identificación de las especies de *Candida* y la determinación de su susceptibilidad a los fármacos antimicóticos es importante para garantizar la eficacia de las estrategias terapéuticas. En relación a esto, algunas de estas nuevas especies han demostrado resistencia a los agentes antifúngicos comunes. La resistencia a los azoles representa un desafío importante. Sin embargo, casi todos los aislados clínicos globales de las especies de *Candida* son susceptibles a las equinocandinas, aunque ha habido algunos informes de susceptibilidad reducida o resistencia a estos antifúngicos en el ajuste de la inmunosupresión severa, la candidemia recurrente, y la exposición prolongada a las equinocandinas. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica*, *C. lusitanae* y *C. tropicalis* pueden causar micosis a pesar del uso profiláctico o terapéutico de las mismas. (Lai, 2013; Pasligh, 2010; Razzaghi-Abyaneh, 2014)

La fungemia, especialmente la causada por *Candida*, puede ser detectada mediante cultivos de sangre. El crecimiento de las diferentes especies de *Candida* en la sangre o en sitios normalmente estériles casi siempre representa una infección verdadera y debe ser tratada como tal. Sin embargo, el crecimiento de dichas especies en sitios no estériles regularmente indica colonización o contaminación. El aislamiento de las especies de *Candida* de muchos sitios no estériles puede ser un indicador de infección oculta en pacientes de alto riesgo; por lo tanto, el diagnóstico de la candidiasis invasiva puede ser difícil. (Miceli, 2011)

Además, las infecciones mixtas causadas por diferentes especies de *Candida* se pueden identificar a partir del mismo paciente en el diagnóstico de una infección. Por lo tanto, la necesidad de métodos rápidos, fiables y rentables con una alta especificidad para la identificación y diferenciación de las especies de *Candida* es de suma importancia. (Pasligh, 2010)

Candida albicans sigue siendo el hongo patógeno más común aislado de muestras clínicas. Sin embargo, esta especie está estrechamente relacionada con una especie enigmática fenotípicamente similar, *Candida dubliniensis*. (Gil-Alonso, 2015)

Candida dubliniensis y *Candida albicans* son 2 especies estrechamente relacionadas de importancia clínica. Comparten varias características fenotípicas, especialmente la habilidad para formar clamidoconidias en agar harina de maíz y tubo germinal en suero. Debido a sus características fenotípicas compartidas, las 2 especies se han identificado erróneamente. Por tanto, la incidencia de la infección por este patógeno causal puede no ser reportada. (Khan, 2012; Lai, 2013)

La diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* es de gran importancia, ya que, nos ayuda a entender mejor la epidemiología y la virulencia de *C. dubliniensis*. Dicha especies es sólo un componente menor de la microbiota normal en la cavidad oral, pero se distribuye en todo el mundo. En los últimos años, sin embargo, el aislamiento de *C. dubliniensis* en pacientes con candidemia ha incrementado. (Wahab, 2014)

La prueba de tubo germinal es la base para la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* de otras especies de *Candida* en la mayoría de los laboratorios de microbiología. Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado diversas pruebas para distinguir *C. dubliniensis* de *C. albicans*. La formación de colonias rugosas o con flecos en agar semilla de Níger, agar semillas de girasol (*Helianthus annuus*) o agar tabaco; la producción de colonias de color verde oscuro en CHROMagar *Candida*; o la incapacidad para crecer en un medio con la concentración de NaCl hipertónico son algunas de las pruebas más utilizadas para discriminar las 2 especies. Del mismo modo, también hay diferencias en la asimilación de los compuestos de carbono. Se ha demostrado que el 95% de los aislamientos de *C. dubliniensis* son incapaces de asimilar xilosa y α -metil-D-glucósido. Sin embargo, las diferencias entre estas dos especies son más pronunciadas en el nivel genético y por esa razón los métodos moleculares son más precisos para distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*. (Khan, 2012; Wahab, 2014)

1.3 *Candida dubliniensis*

En 1995, un informe de Dublín, Irlanda describió una levadura atípica, tubo germinativo y clamidoconidias positiva, aislada con mayor frecuencia de pacientes infectados por VIH que tenían candidiasis oral. La levadura formó un grupo homogéneo por la huella de ADN, diferente de las otras especies de *Candida*, incluyendo a la otra levadura tubo germinativo y clamidoconidias positiva, *Candida albicans*. Los autores propusieron el nombre de *Candida dubliniensis* para esta nueva especie. Desde entonces, una serie de informes han documentado su prevalencia y epidemiología, manifestaciones clínicas, virulencia, características fenotípicas y genotípicas y resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. (Kiehn, 2001)

C. dubliniensis parece ser un patógeno oportunista y normalmente es un componente menor de la flora bucal de los seres humanos, a diferencia de *C. albicans*. La inmunosupresión y el uso de agentes antimicrobianos, incluyendo agentes antifúngicos, aparentemente permite que *C. dubliniensis* aumente en número, en gran medida colonizar la orofaringe, y eventualmente causar enfermedad, candidiasis. Aproximadamente el 25% de los pacientes infectados por el VIH puede ser colonizado por dicha levadura. Se ha aislado de la cavidad oral de aproximadamente el 30% de los pacientes con SIDA y candidiasis oral. Se ha postulado que cuando los pacientes son tratados con agentes

antifúngicos, tales como el fluconazol para la enfermedad oral causada por cepas más susceptibles de *C. albicans*, las cepas más resistentes de *C. dubliniensis* pueden surgir. También se ha encontrado asociada a infección invasiva, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. De igual forma se ha aislado de pacientes VIH negativos y de diferentes sitios y fluidos corporales, incluyendo sangre, orina, etc. (Gamarra, 2015; Kiehn, 2001)

El aumento del número de aislamientos de *C. dubliniensis* hace necesaria su correcta identificación en el laboratorio, ya que puede tener implicaciones epidemiológicas y terapéuticas. Sin embargo, la identificación de *C. dubliniensis* es difícil por la semejanza fenotípica que presenta con *C. albicans*, lo cual obliga a menudo a realizar pruebas especiales poco asequibles en el laboratorio de Microbiología clínica. Los métodos moleculares son las técnicas más fiables para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Sin embargo, se necesitan pruebas fenotípicas precisas, rápidas y económicas para ser utilizadas en los laboratorios de micología de baja complejidad. (Sahand, 2007)

Antes de 1995, todas las especies tubo germinativo y clamidoconidias positivas de *Candida* eran identificadas como *C. albicans*. Desde que se descubrió que *C. dubliniensis* es también tubo germinativo y clamidoconidias positiva, la identificación definitiva debe incluir pruebas adicionales, ya sea fenotípicas o genotípicas. Para el laboratorio de microbiología clínica, el objetivo es detectar e identificar esta levadura recién descrita lo más rápido y económicamente posible, ya que la mayoría de los aislados clínicos son *C. albicans* y sólo un pequeño porcentaje es *C. dubliniensis*. Parece ser que la prueba de detección más útil y sencilla es la presencia o ausencia de crecimiento a 45°C. Los informes hasta la fecha indican que *C. dubliniensis* no crece a 45°C, contrario a la mayoría de las cepas de *C. albicans*. Es así que, las cepas que sean tubo germinativo y clamidoconidias positivas y no crezcan a 45°C pueden ser presuntamente identificadas como *C. dubliniensis*, podrían entonces estas pruebas ser seleccionadas para la identificación definitiva mediante el uso de métodos adicionales, incluyendo sistemas de identificación comerciales, como el color de las colonias en CHROMagar *Candida* y métodos moleculares. *C. dubliniensis* no suele asimilar α -metil-D-glucósido, trialosa, y xilosa. Se ha informado que las colonias de *C. dubliniensis* producen un color verde oscuro distintivo en CHROMagar *Candida* y algunos han sugerido que el uso de este agar

también podría proporcionar un método de cribado útil para este organismo. Sin embargo, ha habido preguntas sobre la utilidad de esta prueba fenotípica como una prueba diferencial rápida y precisa. La apariencia colonial puede variar dependiendo de la temperatura y la exposición de los medios de cultivo a la luz, y si la levadura es del cultivo primario o subcultivo. Los enfoques moleculares basadas en ADN han sido útiles en la elucidación de la taxonomía de *C. dubliniensis*, y también pueden ayudar en la identificación rápida de la levadura. Los métodos de tipificación de ADN utilizados para discriminar *C. dubliniensis* de *C. albicans* incluyen sondas específicas de especie, electroforesis de enzimas multilocus, ADN polimórfico amplificado al azar, el cariotipo electroforético, toma de huellas dactilares de oligonucleótidos, y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción sin sondas. (Gamarra, 2015; Kiehn, 2001; Sahand, 2007)

Aunque *C. dubliniensis* produce tubos germinales y clamidoconidias similares a *C. albicans* en el laboratorio, sus características filogenéticas y genotípicas son distintas. Las dos especies parecen poseer diferentes rasgos de virulencia, como se muestra en estudios de virulencia *in vitro* e *in vivo*. La capacidad de adherirse a las células epiteliales, para producir fosfolipasas y proteasas, y para formar hifas y pseudohifas puede ser atenuado en cepas de *C. dubliniensis*. Por el contrario, el cambio fenotípico de morfología de la colonia y la resistencia de adaptación al fluconazol y otros agentes azólicos parece ser un rasgo más común en *C. dubliniensis*. Se adhiere a proteínas específicas del hospedero, como la mucina, tan fuertemente como lo hace *Candida albicans*, y expresa un gran número de adhesinas de superficie, de las cuales pocas han sido caracterizadas. (Ásmundsdóttir, 2009; Oliva, 2013; Taweechaisupapong, 2012)

OBJETIVO GENERAL

Identificar y diferenciar cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en muestras clínicas de diferentes lugares anatómicos provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla, empleando diversas pruebas bioquímicas y morfológicas, así como corroborar los resultados a través de biología molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la recolección e identificación de muestras con diagnóstico presuntivo de candidiasis siendo *Candida albicans* el agente causal
- Lograr la estandarización de cada una de las pruebas con base a las cepas de referencia utilizadas
- Evaluar el crecimiento en CHROMagar Candida
- Evaluar el crecimiento en el medio de cultivo de Emmons a 42°C
- Evaluar la formación de clamidoconidias en el medio de Girasol con y sin glucosa
- Evaluar la formación de micelio y pigmentación de las colonias en el medio de cultivo SDA con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
- Evaluar la asimilación de carbohidratos mediante API 20C AUX bioMerieux
- Confirmar los resultados obtenidos mediante biología molecular
- Obtener un dato epidemiológico con respecto a la prevalencia de *Candida dubliniensis* como agente causal de candidiasis en México

HIPOTESIS

Si al realizar las diversas pruebas bioquímicas y morfológicas a las muestras clínicas y estas se comportan de manera similar o igual a las cepas de referencia, ya sea *Candida albicans* ATCC 32354 o *Candida dubliniensis* ATCC MYA178, entonces se puede considerar que las muestras clínicas pertenecen a dichas especies según sea el caso.

METODOLOGÍA

A. Recolección e identificación de las muestras

Una vez recibidas las muestras provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla, se resembraron en Agar Dextrosa de Sabouraud (SDA) y se incubaron por 24 horas a 37°C para, posteriormente ser sembradas en CHROMagar Candida, con la finalidad de corroborar que la muestra trabajada fuera presuntamente *Candida albicans* y que fuera una muestra pura; esto último también se evaluó mediante tinción GRAM, para confirmar que no estuvieran contaminadas con bacterias.

Es así, que si el resultado obtenido en el CHROMagar era verde (Figura 2), la muestra era seleccionada y sembrada en tubos con YM inclinado para continuar trabajando con ella y a su vez, conservada en una mezcla 1:1 de leche (Litmus Milk)-glicerol estéril.



Figura 2. Colores obtenidos por cepas con diagnostico presuntivo de *C. albicans* en CHROMagar Candida

Por otro lado, si el resultado era cualquier otro color, es decir, otra especie, dicha muestra solo era conservada en la mezcla de leche-glicerol estéril. Una vez en dicha mezcla, tanto las muestras con diagnostico presuntivo de *Candida albicans* como las que no, se conservaron en congelación a -74°C.

B. Evaluación del crecimiento a 42°C

- **Preparación del medio.**

El medio es preparado con 20 g de dextrosa, 17 g de agar y 10 g de peptona por litro de agua destilada; cabe mencionar que este medio fue preparado con tres peptonas diferentes, peptona de caseína, bacteriológica y de carne, cada una por separado. El pH del medio debe ser de 7.0 ± 0.2 .

El medio es calentado hasta que se hayan disuelto todos los componentes y posteriormente se esteriliza en autoclave a 15 lbs/121°C/15 min. Una vez estéril, se deje enfriar a una temperatura de entre 45-50° y se vierte en cajas Petri estériles.

- **Sembrado**

Partiendo de un cultivo fresco en SDA de entre 24 y 48 hrs, se realizó una suspensión celular igualada al 0.5 del nefelómetro de McFarland en agua destilada estéril. Posteriormente, 25 µl de esta suspensión fueron colocados por triplicado en cada placa y se incubaron a 42°C durante 48 hrs.

- **Lectura de resultados**

Transcurridas las 48 hrs se observa el crecimiento y se evalúa como *nulo*, *pobre*, *moderado* o *abundante*.

C. Producción de clamidoconidias

- **Preparación del medio**

El medio es preparado con 50 g de semilla de girasol pulverizada con 100 ml de agua destilada. Posteriormente se adicionan 900 ml más de agua destilada y se hierve durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se deja enfriar para poder filtrarlo con gasas y se adiciona agua destilada hasta completar 1000 ml.

A esto se le agregan 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de creatinina y 15 g de agar. El medio es dividido en dos partes y solo a una de ellas se le añade 0.5 g de glucosa. Se mezcla bien y se esteriliza en autoclave a 15 lbs/121°C/15 min. Una vez estéril, se deja enfriar a una temperatura de entre 45-50° y se vierte en cajas Petri estériles.

- **Sembrado**

Partiendo de un cultivo fresco en SDA de entre 24 y 48 hrs, se toma una asada y se realiza una estría sobre el agar rasgándolo un poco. Se incuba durante 5 días a 30°C.

- **Lectura de resultados**

Transcurrido el tiempo de incubación se observan características como la presencia o ausencia de micelio y se observan las placas con el microscopio óptico para evaluar la formación de clamidoconidias así como su abundancia (nulas, escasas, moderadas o abundantes) y su disposición (terminales o en racimos) (Figura 3).

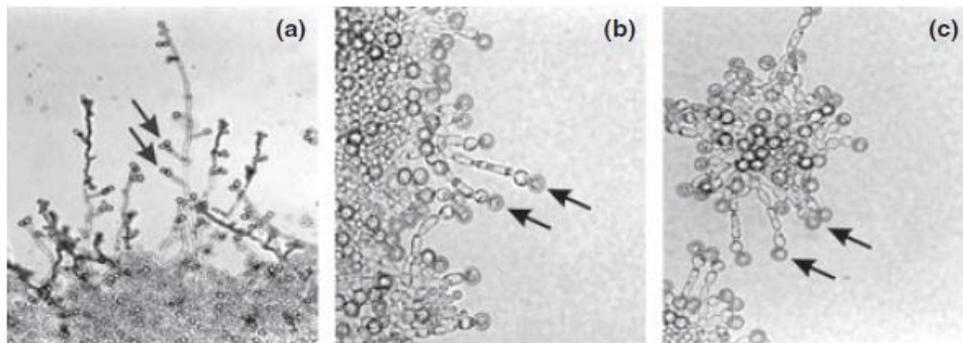


Figura 3. Morfología de las clamidoconidias de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. (a) Ejemplo de una cepa de *C. dubliniensis* donde se demuestra que ocasionalmente las clamidoconidias pueden estar en pares o tripletes. (b). Ejemplo de una cepa de *C. albicans* donde se muestra una única clamidoconidia terminal derivada de una célula suspensoria. (c) Ejemplo de una cepa de *C. dubliniensis* donde se muestra una clamidoconidia terminal idéntica a la observada en la imagen (b). (Ells, 2009)

D. Crecimiento en agar Sabouraud-trifeniltetrazolio

- **Preparación del medio**

El medio es preparado disolviendo 10 g de peptona de caseína, 20 g de glucosa y 20 g de agar en 990 ml de agua destilada. El medio es esterilizado en autoclave a 15 lbs/121°C/15 min.

Por otro lado, se prepara una solución stock de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ) disolviendo 1g en 100ml de agua destilada. Esta solución es esterilizada por filtración.

Posteriormente el medio se enfría a una temperatura aproximada de 55°C y se le agregan 10 ml de la solución stock de TTZ, siendo la concentración final de 0.1g/l. Finalmente se vierte en cajas Petri.

- **Sembrado**

Partiendo de un cultivo fresco en SDA de entre 24 y 48 hrs, se realizó una suspensión celular igualada al 0.5 del nefelómetro de McFarland en agua destilada estéril. Posteriormente, 3 µl de esta suspensión fueron colocados por triplicado en cada placa y se incubaron a 28°C durante 10-12 días.

- **Lectura de resultados**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observan características morfológicas como el color obtenido por la colonia y la producción de un halo micelial. La literatura reporta que *C. albicans* puede presentar tres morfologías distintas: rosa sin halo micelial, rosa con halo micelial y violeta sin halo micelial; por el contrario, *C. dubliniensis* genera colonias violetas o morados con un halo micelial extenso (Figura 4)

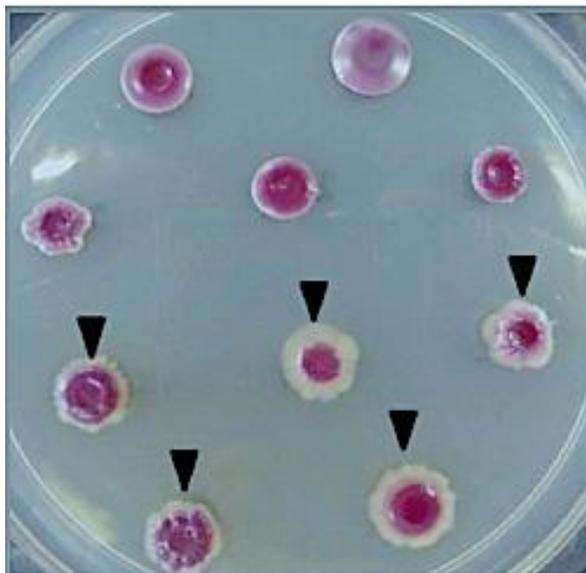


Figura 4. Resultados obtenidos en agar SDA con TTZ, donde las colonias señaladas por la flecha corresponden a cepas de *C. dubliniensis*, mientras que las restantes son colonias pertenecientes a *C. albicans* (Gamarra, 2015)

E. Asimilación de los compuestos de carbono

- **Sembrado**

Para verificar la viabilidad y pureza, los cultivos fueron sembrados en placas de YM por estría cruzada e incubadas a 28°C durante 24-48 hrs. Una vez confirmada la viabilidad y pureza de los cultivos, se realizó la inoculación en las galerías de los sistemas API 20C AUX bioMerieux. Las galerías fueron incubadas a 28°C durante 24-72hrs.

- **Lectura de resultados**

La interpretación de los resultados se realizó con ayuda de la plataforma APIWEB de bioMerieux (Tabla 5)

Tabla 5. Perfiles bioquímicos API 20C AUX bioMerieux para *C. albicans* y *C. dubliniensis*

PRUEBA	REACCIÓN	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
GLU	D-Glucosa	+	+
GLY	Glicerol	-	-
2KG	2-Keto-D-Gluconato	+	+
ARA	L-Arabinosa	-	-
XYL	D-Xilosa	+	+
ADO	Adoitol	+	+
XLT	Xilitol	+	+
GAL	Galactosa	+	+
INO	Inositol	-	-
SOR	Sorbitol	+	+
MDG	α-Metil-D-Glucosido	+	-
NAG	N-Acetil-D-Glucosamina	+	+
CEL	Celobiosa	-	-
LAC	Lactosa	-	-
MAL	Maltosa	+	+
SAC	Sacarosa	+	+
TRE	Trealosa	+	-

MLZ	Melzitosa	-	-
RAF	Rafinosa	-	-

F. Pruebas de biología molecular

- Las cepas fueron identificadas mediante PCR por el Biólogo Juan Carlos Estrada Mora en la Colección Mexicana de Cultivos Microbianos del CINVESTAV.

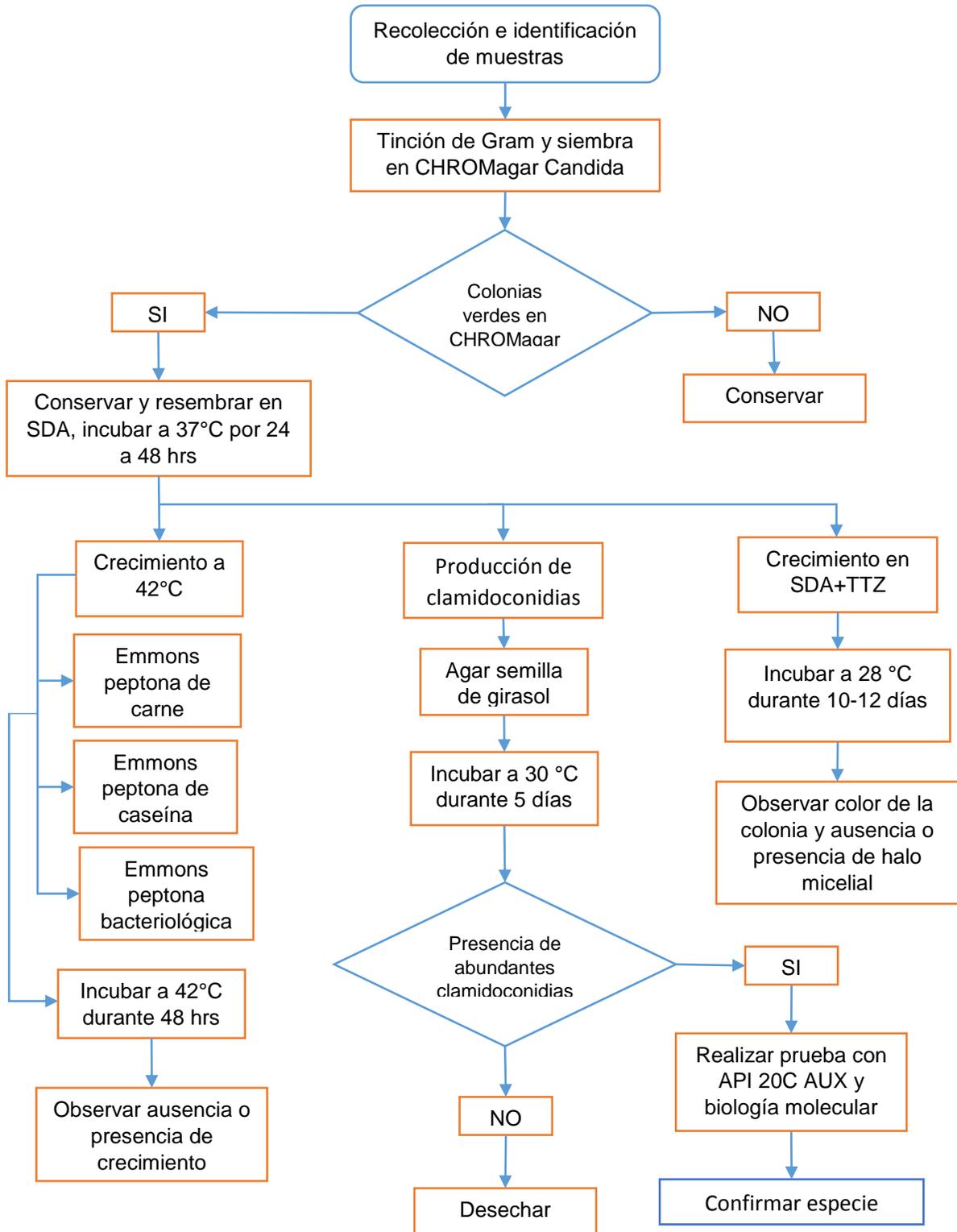


Diagrama 1. Metodología general del estudio

RESULTADOS

Las 102 muestras clínicas empleadas en el presente estudio fueron seleccionadas del total de las muestras provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla puesto que originaron un tono verde en CHROMagar Candida al ser sembradas en el laboratorio, ya que esto significa la posible presencia de *Candida dubliniensis*. Los datos de dichas cepas fueron recopilados en la Tabla 6.

Tabla 6. Identificación de las muestras provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla

Clave original	Clave nueva	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico presuntivo	Diagnóstico confirmatorio
2	L17-1-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
3	L17-2-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
6	L17-3-15	INP	INP	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	L17-4-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
106	L17-5-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
147	L17-6-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
198	L17-7-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
216	L17-8-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
241	L17-9-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
267	L17-10-15	INP	Faríngeo	<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>
274	L17-11-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
298	L17-12-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
328	L17-13-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
481	L17-14-15	Femenino	Vaginal	<i>Desconocido</i>	<i>C.albicans</i>
498	L17-15-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
524	L17-16-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
534	L17-17-15	Femenino	Vaginal	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
543	L17-18-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
614	L17-19-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
624	L17-20-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
625	L17-21-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
650	L17-22-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
683	L17-23-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
704	L17-24-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
731	L17-25-15	INP	Secreción	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>

MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN ENTRE
Candida albicans Y *Candida dubliniensis*

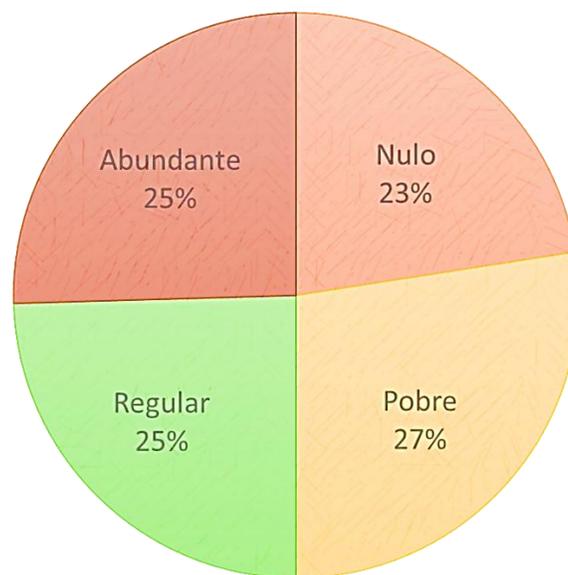
786	L17-26-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
796	L17-27-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
820	L17-28-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
929	L17-29-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
939	L17-30-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
940	L17-31-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
941	L17-32-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
943	L17-33-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
947	L17-34-15	Masculino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
953	L17-35-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
956.1	L17-36-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
956.2	L17-37-15	Femenino	Vaginal	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
957	L17-38-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
963	L17-39-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
971	L17-40-15	Masculino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
982	L17-41-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
984	L17-42-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
988	L17-43-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
1018	L17-44-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1171	L17-45-15	Femenino	Urocultivo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
1201	L17-46-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
1269	L17-47-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1440	L17-48-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1575.1	L17-49-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1575.2	L17-50-15	Femenino	Vaginal	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
1586	L17-51-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
1621	L17-52-15	Femenino	F-S	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
2350	L17-53-15	Femenino	Urocultivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2404	L17-54-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2422	L17-55-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2465	L17-56-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2527	L17-57-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2965	L17-58-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
3105	L17-59-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
3218.1	L17-60-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3800	L17-61-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN ENTRE
Candida albicans Y *Candida dubliniensis*

3812	L17-62-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
4034	L17-63-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4349	L17-64-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4459	L17-65-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4533	L17-66-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
4537	L17-67-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4730	L17-68-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
4812	L17-69-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4814	L17-70-15	INP	INP	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4853	L17-71-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4853.1	L17-72-15	INP	URO	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
5376	L17-73-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5507	L17-74-15	INP	Secreción	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5507.2	L17-75-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
5509	L17-76-15	Masculino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5674	L17-77-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6321	L17-78-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6920	L17-79-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7120	L17-80-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7661	L17-81-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
7760	L17-82-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8750.1	L17-83-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8750.2	L17-84-15	Femenino	URO	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
8881	L17-85-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9072	L17-86-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9085	L17-87-15	Masculino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9154	L17-88-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9289	L17-89-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9653	L17-90-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9655	L17-91-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9676	L17-92-15	INP	Secreción glandular	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9676.1	L17-93-15	INP	Secreción glandular	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9686	L17-94-15	Femenino	Vaginal	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9686.1	L17-95-15	Femenino	Vaginal	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>

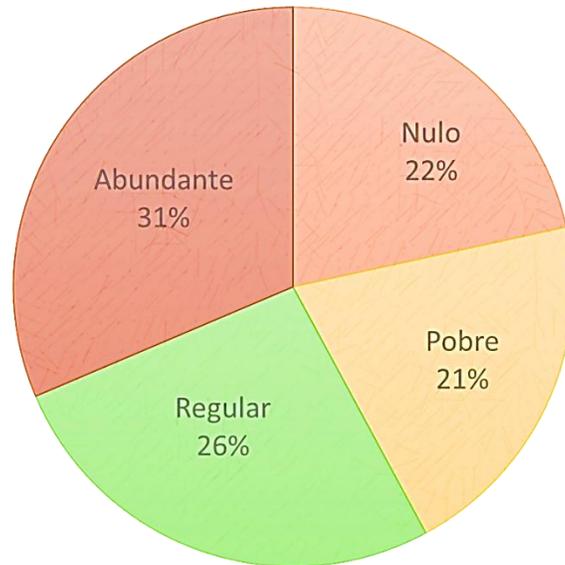
9708	L17-96-15	INP	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
9753	L17-97-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
9763	L17-98-15	Femenino	INP	INP	<i>C. albicans</i>
9895	L17-99-15	Femenino	URO	INP	<i>C. albicans</i>
9895.1	L17-100-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
2509095.1	L17-101-15	INP	INP	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2509095.2	L17-102-15	Femenino	INP	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
INP.- Información no proporcionada por HRT.					

Una vez que fueron seleccionadas las cepas, se realizó la evaluación del crecimiento a 42°C en los tres medios de Emmons, donde se obtuvo que, en el medio de Emmons con peptona bacteriológica un 23% de las cepas tuvo un crecimiento nulo, 27% un crecimiento pobre, 25% un crecimiento regular y el 25% restante un crecimiento abundante. (Gráfica 1)



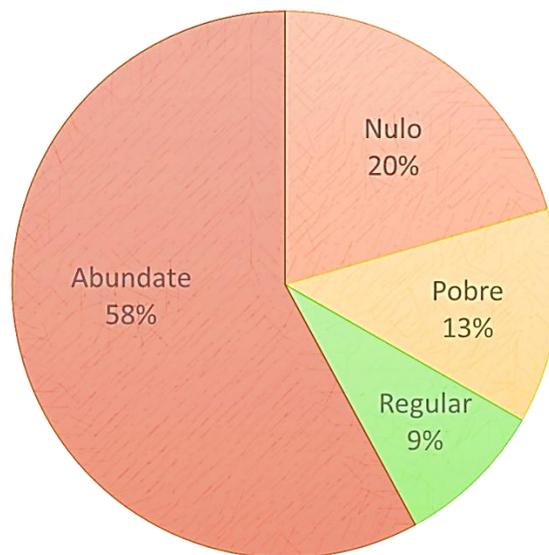
Gráfica 1. Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona bacteriológica

En el caso del medio de Emmons con peptona de carne se obtuvo que un 22% de las cepas tuvo un crecimiento nulo, 21% un crecimiento pobre, 26% un crecimiento regular y el 31% restante un crecimiento abundante. (Gráfica 2)



Gráfica 2. Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona de carne

Por otro lado, en el medio de Emmons con peptona de caseína se obtuvo que un 20% de las cepas tuvo un crecimiento nulo, 13% un crecimiento pobre, 9% un crecimiento regular y el 58% restante un crecimiento abundante. (Gráfica 3)



Gráfica 3. Porcentaje de crecimiento en el medio de Emmons con peptona de caseína

Posteriormente, cada cepa fue sembrada en el medio semilla de Girasol sin glucosa y con glucosa, en los cuales no solo fue evaluada la capacidad de producción de clamidoconidias sino también la cantidad y la disposición de las mismas comparadas

siempre con las producidas por las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 32354 (Figura 5) y *Candida dubliniensis* ATCC MYA 178 (Figura 6).

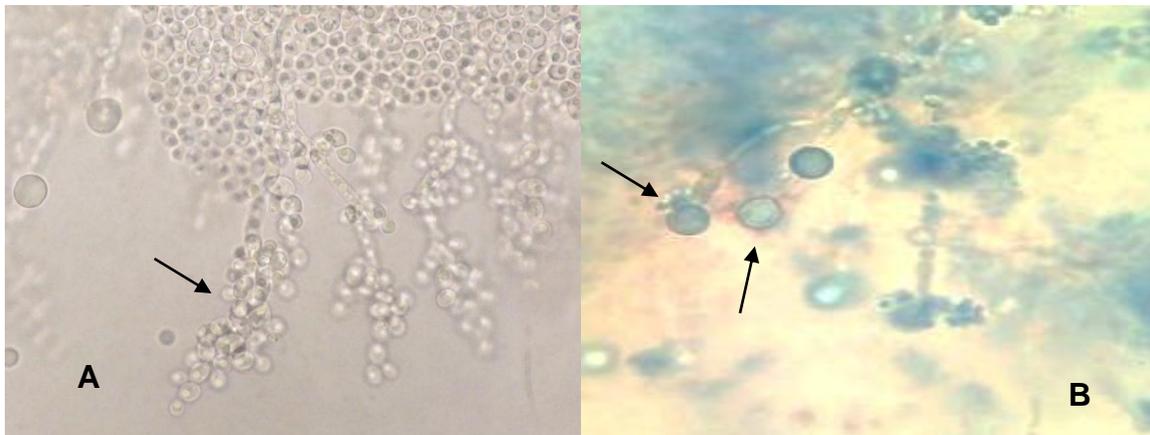


Figura 5. *Candida albicans* ATCC 32354. A) Blastoconidias (flecha) obtenidas tanto en agar semilla de Girasol sin glucosa como en agar semilla de Girasol con glucosa. B) Clamidoconidias únicas y terminales teñidas con azul de algodón (flecha) en agar semilla de Girasol con y sin glucosa.

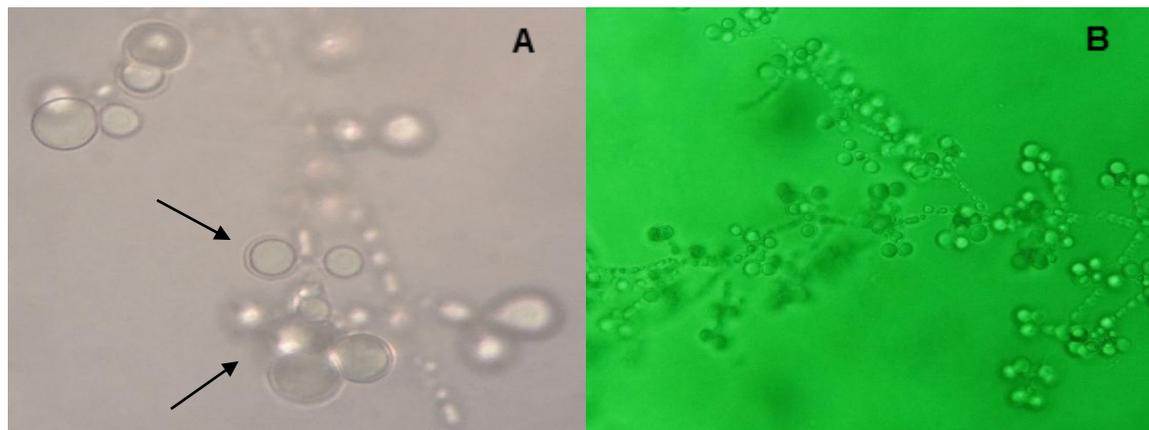
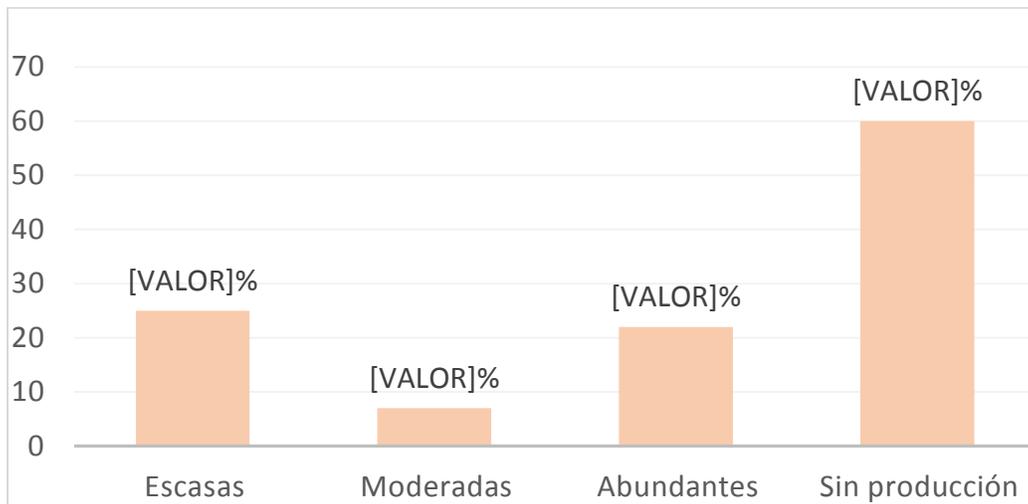


Figura 6. *Candida dubliniensis* ATCC MYA 178. A) Clamidoconidias (flecha) obtenidas tanto en agar semilla de Girasol sin glucosa como en agar semilla de Girasol con glucosa. B) Clamidoconidias en racimos o tripletes en agar semilla de Girasol con y sin glucosa observadas con microscopio de contraste de fases.

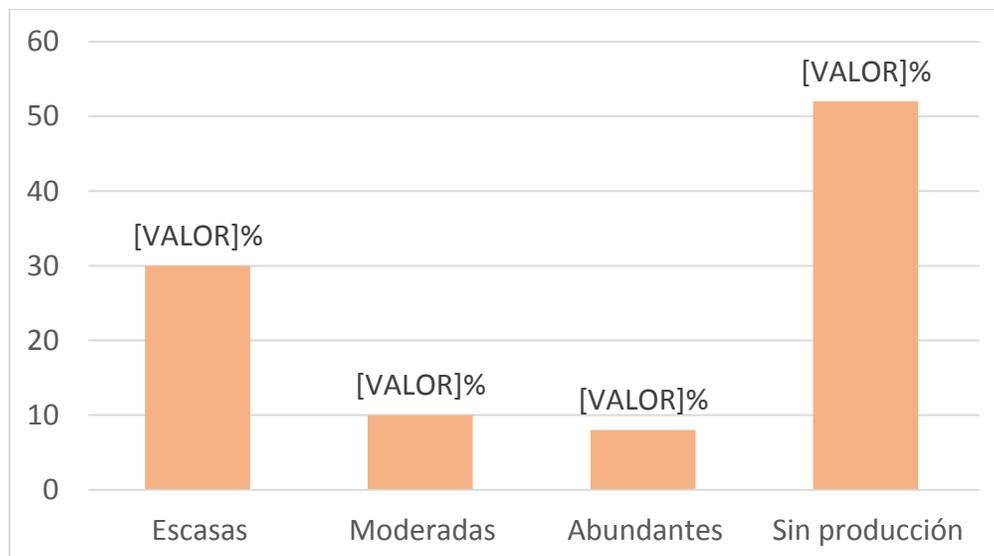
En este caso se obtuvo que para el agar semilla de Girasol con glucosa el 60% de las cepas no produjo clamidoconidias mientras que el 40% restante si lo hizo. De este 40% que si produjo clamidoconidias, el 9% tuvo una producción abundante comparable con la

producida por *Candida dubliniensis* ATCC MYA 178, el 7% moderada y el 25% escasa. (Gráfica 4)



Gráfica 4. Porcentaje de la abundancia de clamidoconidias producidas en agar semilla de Girasol con glucosa

Por otro lado, en el agar semilla de Girasol sin glucosa se obtuvo que el 53% de las cepas no produjo clamidoconidias mientras que el 47% si lo hizo. De este 47% que si produjo clamidoconidias, el 8% tuvo una producción abundante comparable con la producida por *Candida dubliniensis* ATCC MYA 178, el 10% moderada y el 30% escasa. (Gráfica 5)



Gráfica 5. Porcentaje de la abundancia de clamidoconidias producidas en agar semilla de Girasol sin glucosa

Como un hallazgo extra, se observó la presencia de microvesículas en ambos medios, siendo del 6% para el medio de Girasol sin glucosa y del 5% en el caso del medio con glucosa. (Figura 7)



Figura 7. Microvesícula en agar semilla de girasol (flecha).

Adicionalmente, esta prueba también se realizó en agar caseína, agar linaza y agar niger, únicamente para nuestras cepas de referencia. En todos ellos, tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* generaron clamidoconidias abundantes, terminales y en racimos o únicas. (Figura 8 y Figura 9). Debido a que no se obtuvieron resultados que demostraran una diferencia entre ambas especies fue que no se realizaron dichas pruebas para las muestras clínicas.

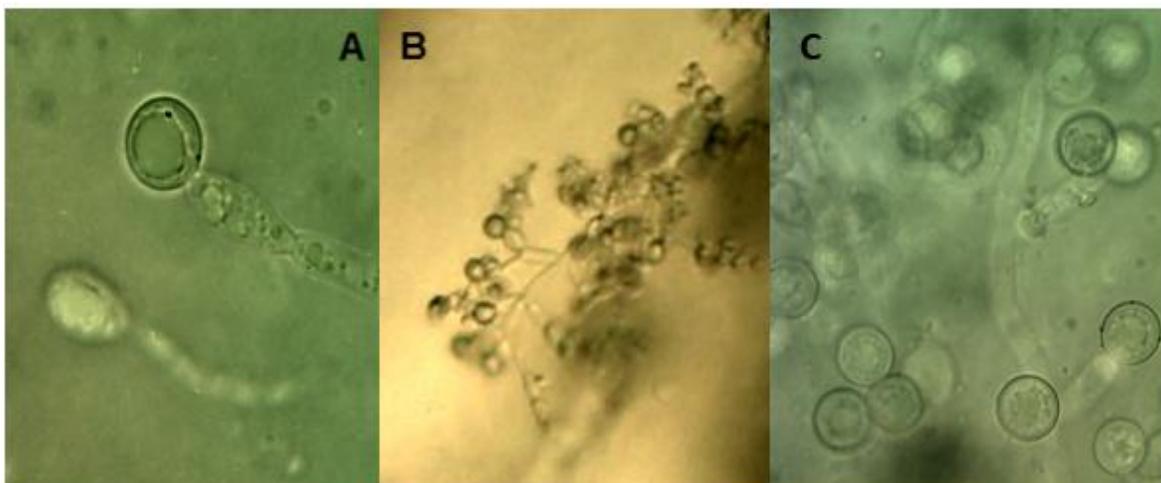


Figura 8. *Candida albicans* ATCC 32354. Clamidoconidias obtenidas en agar semilla de linaza (A), agar caseína (B) y agar Niger (C).

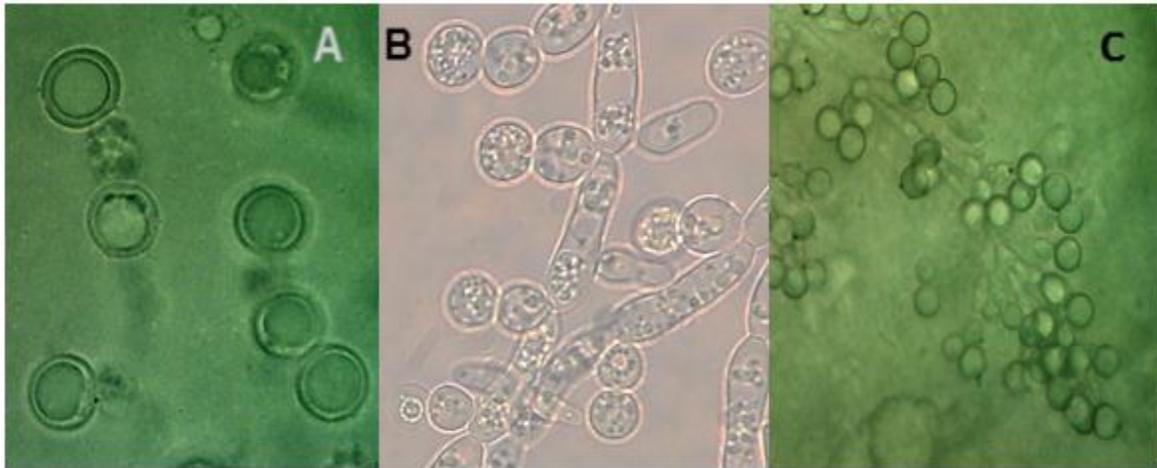


Figura 9. *Candida dubliniensis* ATCC MYA178. Clamidioconidias obtenidas en agar semilla de linaza (A), agar caseína (B) y agar Níger (C).

En cuanto al crecimiento en agar Sabouraud-trifeniltetrazolio, se obtuvo que solo una (L17-21-15) de las 102 cepas analizadas, tuvo un crecimiento similar al reportado en la literatura para *Candida dubliniensis*; es decir, colonia de color morado con un halo micelial (Figura 10).

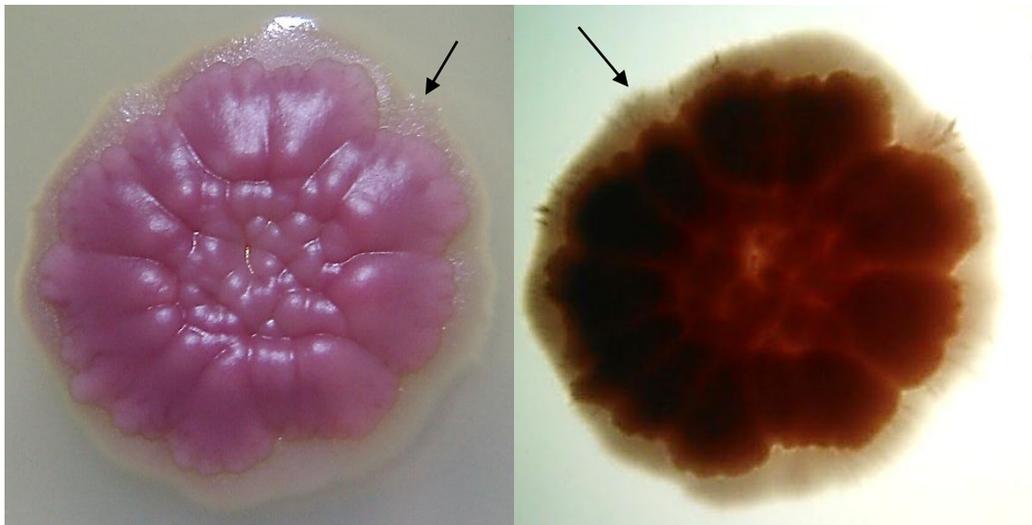


Figura 10. Muestra L17-21-15, se observa colonia de color morado con halo micelial (flecha).

Sin embargo, al ser comparada con los resultados obtenidos para las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 32354 y *Candida dubliniensis* MYA 178, dicha cepa no es similar a ninguna de las dos anteriores (Figura 11). Esto podría indicar diferencias de comportamiento a pesar de ser la misma especie, lo cual respresentaría un conflicto para

la interpretación de no contar con las pruebas ya antes mencionadas, puesto que podría pensarse que se trata de una cepa de *Candida dubliniensis*.

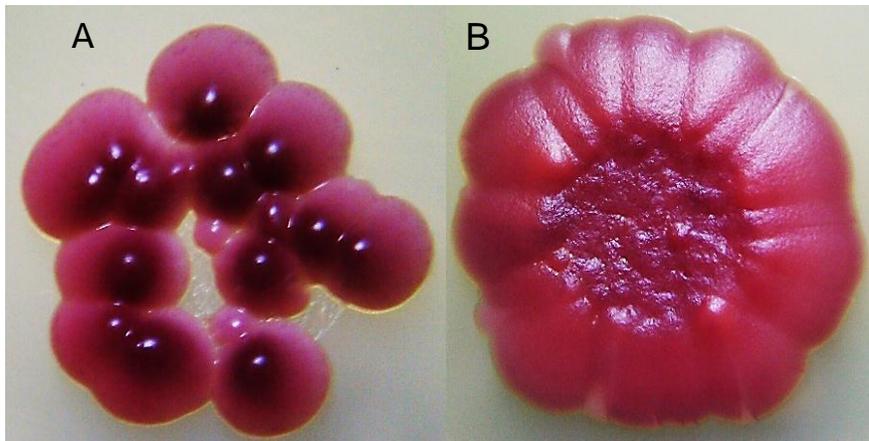


Figura 11. Colonias en agar SDA con TTZ de ambas cepas de referencia. A) *Candida albicans* ATCC 32354 colonias de color morado intenso sin halo micelial. B) *Candida dubliniensis* ATCC MYA 178 colonias de color violeta sin halo micelial.

Partiendo de los resultados obtenidos en las pruebas ya mencionadas, fueron seleccionadas 19 de las 102 muestras para ser enviadas a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV donde se les realizó un perfil bioquímico con el sistema API 20C AUX bioMerieux. Los resultados obtenidos en dicha prueba se encuentran recopilados en la Tabla 7, en la cual están marcados en rosa ambas cepas de referencia y los tres carbohidratos más importantes para la diferenciación entre ambas especies, xylosa, α -metil-D-glucosido y trealosa; puesto que dichos carbohidratos pueden ser asimilados por *Candida albicans* pero no por *Candida dubliniensis*.

Finalmente, la confirmación de especie de estas 19 cepas fue realizada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV mediante biología molecular (PCR), siendo todas ellas *Candida albicans*.

Es así que, las 102 muestras clínicas provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla resultaron ser *Candida albicans* una vez realizadas todas las pruebas.

Tabla 7. Perfiles bioquímicos API 20C AUX bioMerieux a las 72 hrs

PRUEBA REACCION	GLU D- Glucosa	GLY Glicerol	2KG 2-Keto-D- Gluconato	ARA L- Arabinosa	XYL D- Xilosa	ADO Adonitol	XLT Xilitol	GAL Galactosa	INO Inositol	SOR Sorbitol	MDG α-Metil-D- Glucosido	NAG N-Acetil-D- Glucosamina	CEL Celobiosa	LAC Lactosa	MAL Maltosa	SAC Sacarosa	TRE Trealosa	MLZ Melzitosa	RAF Rafinosa
MYA-178-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-11-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-14-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-18-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-21-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-22-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-29-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-38-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-42-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-52-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-58-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-60-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-61-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-63-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-64-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-77-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-79-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-85-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-91-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-101-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L-17-103-15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

DISCUSIÓN

En décadas recientes se ha comprobado un marcado incremento de las micosis, debido al aumento paralelo de pacientes de alto riesgo, como los trasplantados, los que tienen neoplasias, los inmunodeprimidos (VIH entre otras), los recién nacidos de bajo peso, los pacientes de edad avanzada, a los que se les han practicado cirugías extensas y los hospitalizados en las unidades de cuidado intensivo (UCI). En estos grupos, estas infecciones predominan debido a que la mayoría de los pacientes reciben múltiples tratamientos como antibióticos de amplio espectro, esteroides, citotóxicos, y requieren uso de catéteres intravasculares y procedimientos diagnósticos invasores. Se estima que el 5% de los pacientes hospitalizados en las UCI van a desarrollar una enfermedad por hongos, especialmente candidiasis invasora (3%-6%) que acarrea morbilidad y mortalidad altas. (De Bedout, 2010)

Paralelamente, se han venido observando cambios en la epidemiología de las especies de *Candida* y aunque *Candida albicans* es la especie más relevantes del género, la incidencia de las infecciones causadas por especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* ha ido en aumento. Además, existen variaciones en su prevalencia y en la resistencia de algunas especies a los antimicóticos según su localización geográfica. (De Bedout, 2010)

C. dubliniensis comparte muchas características fenotípicas con *C. albicans*, y aunque esta especie ha sido aislada e identificada hace sólo unos 20 años a partir de pacientes con SIDA e infectados por el VIH, es probable que haya estado presente durante al menos 50 años. La incidencia real de la candidiasis por *C. dubliniensis* aún se desconoce debido principalmente a la dificultad de distinguir esta especie de *C. albicans*. (De Bedout, 2010)

Por todo lo anterior, el desarrollo de un método rápido, específico y sensible para la identificación de especies de *Candida* es crucial para el diagnóstico y la terapia precisos. Además, el método debe ser barato y fácil de usar para su aplicación en los laboratorios de rutina. El cultivo de las levaduras en medio de crecimiento sólido, y su caracterización fenotípica, es fácil de realizar y con frecuencia es el método de elección. (Pasligh, 2010)

El objetivo de este trabajo fue tratar de identificar un método convencional de entre un grupo de pruebas de uso común que pudiera producir resultados comparables y reproducibles como una herramienta para la discriminación de dos especies estrechamente relacionadas *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

El crecimiento en placas de agar especiales, tales como CHROMagar® *Candida*, es una herramienta muy útil para la determinación de la pureza de los aislados clínicos; así como la diferenciación de especies de acuerdo al color obtenido. Nuestra observación arrojó que el 100% de las muestras clínicas eran cultivos puros, obteniendo para cada una de ellas una tonalidad verde homogénea. Por lo cual, no hubo la necesidad de purificar ninguna muestra.

En contraste con otros estudios que demuestran que es posible utilizar este método para una diferenciación entre estas dos especies, en el presente ensayo se encontró que se obtiene una baja sensibilidad para la discriminación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. El tono de verde (claro u oscuro) no podía distinguir de manera fiable entre las dos especies de *Candida*. Además, la temperatura de incubación tiene una influencia sobre los resultados obtenidos, ya que los aislados de *C. dubliniensis* que se activan después de ser almacenados a bajas temperaturas (-20°C o menos) pueden perder su capacidad de formar colonias de color verde oscuro, y el desarrollo de un color verde claro solamente.

Además de los medios cromogénicos, hay varios métodos de cultivo en placa descritos para la diferenciación entre ambas especies, uno de ellos y quizás uno de los más utilizados es el medio de Emmons. Dicho medio es una modificación de la fórmula descrita por Sabouraud para el cultivo de hongos, particularmente aquellos asociados a infecciones de la piel. Emmons modificó la fórmula ajustando el pH lo más cercano a la neutralidad y disminuyendo el contenido de dextrosa con la finalidad de tener una mayor recuperación del hongo. Aunque el bajo pH de este medio puede favorecer el crecimiento de algunos hongos, especialmente los dermatofitos, algunos hongos son inhibidos. La dextrosa proporciona una fuente de energía y la peptona la fuente de factores de crecimiento nitrogenados.

Debido a que la fórmula no especifica el tipo de peptona utilizada, para el presente estudio el medio fue preparado con tres peptonas diferentes de manera individual e

incubados todos a una temperatura de 42°C pues según se reporta en la literatura *C. dubliniensis* muestra un crecimiento altamente restringido o nulo bajo esta condición, contrario a lo que se reporta para *C. albicans*.

Si bien es cierto que se observó dicho comportamiento en los tres medios de Emmons, como se muestra en las gráficas 1, 2 y 3, no se obtuvo un patrón en cuanto al crecimiento de las cepas; es decir, una misma cepa podía crecer o no en uno o en dos de los tres medios, pudiendo incluso no tener crecimiento con una peptona y tener crecimiento abundante con otra de ellas. Este hecho podría atribuirse a la composición de las diferentes peptonas, suponiendo que alguna de ellas tenga los nutrientes necesarios para el crecimiento de cada cepa en específico. De acuerdo con estos resultados contradictorios, la discriminación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* por el crecimiento a temperatura elevada puede no ser fiable.

Otro método descrito para la discriminación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* es la producción de clamidoconidias en diversos medios, incluido el agar semilla de girasol; para el cual la literatura reporta que *C. dubliniensis* se caracteriza por la producción de un micelio largo alrededor de la impronta observable a simple vista y por la formación de clamidoconidias después de 48 a 72 h observables mediante microscopía óptica. Por otro lado, *C. albicans* también produce micelio después de 10 días de incubación pero no clamidoconidias en este medio. (Monteiro, 2011)

Adicionalmente se sabe que, en general, *C. dubliniensis* tiene una elevada producción de clamidoconidias y estas suelen estar en pares o en tripletes al final de la hifa o en las ramificaciones de esta (Figura 3-a). Por el contrario, *C. albicans* tiene una baja producción de clamidoconidias y estas suelen ser únicas y terminales (Figura 3-b). (Ells, 2009)

Sin embargo, nuestros resultados demuestran que hay ciertas diferencias con lo dicho anteriormente, en cuanto a que no todas las cepas con producción de clamidoconidias tenían una producción de micelio largo alrededor de la impronta y que, aunque existe una diferencia marcada en la abundancia y disposición de las clamidoconidias entre las cepas de *C. albicans* (Figura 5) y las de *C. dubliniensis* (Figura 6), la primera también las genera. Como una observación adicional, tampoco fueron necesarios 10 días de incubación para

la observación de micelio en aquellas cepas que lo generaron y que eran sospechosas de ser *Candida albicans*.

Por otro lado, algunos autores sugieren que la temperatura de incubación es un factor importante para la formación de clamidoconidias y que la variación en la concentración de los componentes del medio y en la naturaleza del extracto utilizado no altera el resultado final. Khan et al. (2005) mostró la misma capacidad de diferenciación de las especies cuando se comparan agar semilla de girasol preparada con la semilla entera y medio preparado sólo con la cáscara de la semilla cuando los aislados se incubaron a la misma temperatura de 28 ° C. (Monteiro, 2011)

Nuestra investigación concuerda con estas observaciones, puesto que no hubo ninguna diferencia en la producción y disposición de las clamidoconidias con respecto a si el medio contenía o no glucosa.

El tetrazolio es un compuesto incoloro, soluble, que es captado por las células y reducido en el sitio de las oxidaciones enzimáticas con la liberación del ácido formazán, un compuesto insoluble altamente pigmentado (rojo) (Figura 12). El TTZ puede actuar como u aceptor artificial de electrones para las enzimas ligadas al nucleótido piridina, es decir, succinato deshidrogenasa, citocromo oxidasa, NAD y NADP, en la cadena biológica oxidativa. La sal es reducida por el citocromo *b* o por el *c* o puede competir por los electrones de la citocromo oxidasa. La oxidación es mediada por la reducción de deshidrogenasas específicas por el sistema de transporte de electrones. (MacFaddin, 2000)

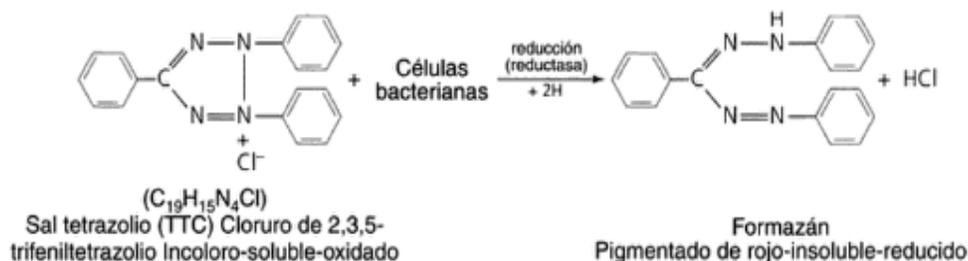


Figura 12. Reacción de reducción de TTZ a formazán (MacFaddin, 2000)

La reducción de TTZ se ha utilizado como una ayuda para la identificación de *Candida* desde la década de 1980. En 1992, Quindós et al. informaron el uso del morfotipo colonial en SDA + TTZ como una herramienta para la identificación de especies de *Candida*. En ese informe, 93.67% y el 3,6% de las cepas identificadas fenotípicamente como *C. albicans* eran de color rosa o violeta, respectivamente, y sólo el 2% de los aislamientos de *C. albicans* mostraron colonias de color violeta con un halo micelial. Sería posible que estos resultados representen una incidencia del 2% de *C. dubliniensis* en la colección de levaduras utilizada. Esta incidencia no se informó puesto que *C. dubliniensis* se propone como especie separada tres años más tarde. En 1998, la reducción de TTZ se sugirió como una herramienta útil para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* por Velegrakyand Logotheti. Sin embargo, en la obra citada, se utiliza otro medio basal; no hay una descripción del número de cepas aisladas y cómo los autores identificaron las cepas como *C. albicans* o *C. dubliniensis*. Por consiguiente, no se realizó la evaluación de especificidad y sensibilidad. También, Velegraky y Logotheti evaluaron el color de la colonia como la única característica. (Gamarra, 2015)

Recientemente, Gamarra et al. evaluaron tres características del morfotipo en SDA + TTZ como una herramienta para la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* utilizando un total de 126 cepas (122 aislados de diferentes fuentes clínicas) identificadas por dos técnicas moleculares diferentes. Ellos reportan que el método descrito tiene 100% de especificidad y sensibilidad cuando el color de la colonia y halo micelial se consideran juntos (todas las cepas de *C. dubliniensis* mostraron colonias de color violeta con un gran halo de micelio blanco). Además no proponen esta prueba como un medio de aislamiento primario para distinguir entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* directamente a partir de muestras biológicas ya que otras especies de *Candida* (por ejemplo, *C. tropicalis*) también son capaces de reducir las sales de TTZ. Sugieren el uso de este medio debido a su bajo costo, a que es una prueba fácil de realizar y después de una evaluación de tubo germinativo o partiendo de una colonia verde en Chromagar® *Candida*. (Gamarra, 2105)

En el presente estudio se realizó la prueba tomando en cuenta lo publicado por Gamarra et al. Sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado en la literatura puesto que la cepa de referencia de *Candida dubliniensis* no genero el halo micelial observado para esta especie, únicamente, la coloración violeta (Figura 9-b). Mientras que nuestra cepa de referencia de *Candida albicans* produjo el resultado esperado, colonias moradas sin halo

micelial. En este caso, solo una de las 102 muestras clínicas generó un halo micelial blanco alrededor de la colonia la cual era de color morado claro; por lo que podemos suponer, según lo que indica la literatura y sin compararla con nuestra cepa de referencia, que es *Candida dubliniensis*.

Esta prueba tiene como desventaja que es necesario por lo menos siete días de incubación para ver el resultado lo que lo vuelve un método poco útil en un laboratorio clínico. Sin embargo, puede ser útil para grandes estudios epidemiológicos. (Gamarra, 2105)

Candida tiene la capacidad de asimilar una amplia gama de compuestos de hidratos de carbono como su única fuente de carbono, y las diferencias en estos perfiles de asimilación se han utilizado para diferenciar a *C. dubliniensis* de *C. albicans*. Estas diferencias incluyen la incapacidad de *C. dubliniensis* asimilar α -metil-D-glucósido (MDG), lactato (LAT) o xilosa (XYL). Varios autores han evaluado y comparado el uso de sistemas de identificación disponibles en el mercado, que se basan en los perfiles de asimilación de fuente de carbono, en la diferenciación de estas dos especies. Evaluando el sistema API 20C AUX, Pincus et al. encontró que, aunque la precisión de identificación final fue baja, con un 95% de los aislados identificados erróneamente como *C. albicans*, ninguna de las 80 cepas aisladas de *C. dubliniensis* podría asimilar XYL o ODM después de 72 h de incubación, mientras que los porcentajes de las bases de datos para *C. albicans* de estos sustratos son 88 y 85, respectivamente. Gales et al. confirmaron estos resultados para el sistema API 20C AUX en 66 aislamientos de *C. dubliniensis* y 100 de *C. albicans*. Ninguno de los aislados ensayados de *C. dubliniensis* pudo asimilar XYL o ODM, mientras que todas las cepas de *C. albicans* pudieron asimilar al menos una de estas dos fuentes de carbono. Jabra-Rizk y col. también encontraron que ninguna de las cepas analizadas de *C. dubliniensis* utilizando este sistema podría asimilar XYL o ODM. (Ells, 2009)

Del mismo modo, varios autores utilizaron las diferencias en la asimilación de trehalosa como un carácter distintivo. Sin embargo, Sullivan et al. encontraron que la asimilación de trehalosa es variable entre los aislados caracterizados originalmente de *C. dubliniensis* y Pincus et al. informaron que, en función del sistema de identificación utilizado, diferentes porcentajes de los aislados ensayados de *C. dubliniensis* podrían asimilar trehalosa. (Ells, 2009)

Nuestros resultados difieren de lo dicho anteriormente, puesto que las 19 cepas a las que se les realizó el análisis y nuestra cepa ATCC de *C. dubliniensis*, tuvieron la capacidad de asimilar tanto a la xilosa como al α -metil-D-glucósido después de 72 hrs de incubación. Sin embargo, en el caso de la trehalosa nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura, ya que nuestra cepa de referencia tuvo la capacidad de asimilarla con el sistema API 20C. Es así, que podemos decir que el análisis de asimilación de carbohidratos con el sistema API 20 C no es un método fiable para la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

Finalmente, la confirmación de especie de los aislados y las cepas de referencia fue realizada mediante PCR confirmando que las 19 muestras sospechosas de ser *C. dubliniensis* son *C. albicans*. Siendo entonces que, las 102 muestras clínicas analizadas en este estudio son *C. albicans*.

Dicho resultado es inesperado y sorpresivo; puesto que, si nos basáramos únicamente en los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas tanto morfológicas como bioquímicas, podríamos haber asegurado que estas 19 cepas sospechosas de ser *Candida dubliniensis* realmente eran *Candida dubliniensis*; lo cual, implicaría un resultado erróneo al realizar una identificación equivocada, significando a nivel clínico un mal diagnóstico y por lo tanto un tratamiento equivocado para el paciente, que lo podría llevar incluso a la muerte, recordando que la infección por esta especie se da en mayor medida en pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos; con lo cual se hace hincapié en la importancia que tiene hoy en día la utilización de las pruebas de biología molecular para dar un diagnóstico confiable y certero cuando de patógenos no comunes se trata.

CONCLUSIONES

Aunque la literatura indica la existencia de pruebas morfológicas y bioquímicas para la discriminación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, dichas pruebas no resultan ser contundentes, y se requiere la biología molecular para poder diferenciar entre ambas especies.

Las pruebas fenotípicas son útiles para la identificación presuntiva de *C. dubliniensis*, pero no proporcionan un diagnóstico definitivo. Los métodos moleculares permiten una identificación definitiva, pero requieren equipos especializados que no están disponibles en todos los laboratorios. Los ensayos fenotípicos proporcionan características pertinentes que, si se combinan, podrían ser útiles para la identificación en el laboratorio de especies de *Candida*.

En cuanto a la prevalencia de *C. dubliniensis* esta sigue siendo una cuestión de discusión en la literatura, con estudios que informan de la ausencia de esta especie, otros informes reportan una baja prevalencia (0,2% a 5,0%), otros media (5,1% a 18%) y algunos otros reportan tasas altas (por encima de 18 %). En América del Sur en comparación con otros países de Europa y los Estados Unidos, esta prevalencia parece ser menor. (De Bedout, 2010)

En el presente estudio, la población estudiada pertenecía a un grupo de pacientes sanos es decir, la probabilidad de estar infectados con *C. dubliniensis* era mínima, tal vez sea esta la razón del porque esta especie no se recuperó. Confirmando así la ausencia de esta especie para el grupo estudiado, pero se deja abierta la posibilidad de que en estudios futuros estas pruebas sean de utilidad para el análisis en una población de pacientes con una mayor probabilidad de estar infectados con *C. dubliniensis*, es decir, pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos.

ANEXOS

BBLTM CHROMagar™ Candida Medium

USO PREVISTO

BBL CHROMagar Candida Medium es un medio para el aislamiento y la identificación de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de muestras clínicas. Inhibe el crecimiento de bacterias y también puede utilizarse como medio de aislamiento selectivo para otras especies de levaduras y para hongos filamentosos.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

BBL CHROMagar Candida Medium es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida [Torulopsis] glabrata* y otras especies). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias.

Peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en **BBL CHROMagar Candida Medium**. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos.

CHROMagar Candida Medium fue desarrollado por A. Rambach y lo distribuye BD Diagnostic Systems bajo acuerdo de licencia con CHROMagar, París, Francia.

REACTIVOS

BBL CHROMagar Candida Medium

Fórmula* por litro de agua purificada

Cromopeptona	10,0 g
Glucosa	20,0
Mezcla cromógena	2,0
Cloranfenicol	0,5
Agar	15,0

pH 6,0 ± 0,3

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

Solamente para uso profesional.

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro.

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los períodos de incubación recomendados. Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener los detalles, véase el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**). Incubar las placas en atmósfera aerobia durante 20 – 48 h a 35 ± 2 °C. Tener en cuenta que se requiere una incubación de 42 h para que las colonias desarrollen por completo el color.

Cepas BBL CHROMagar Candida Medium

Cepas	BBL CHROMagar Candida Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Crecimiento de bueno a excelente; colonias grandes y planas, de color de rosado claro a rosa, con un borde blancuzco
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9968	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color gris azulado, con o sin halos de color violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inhibición de parcial a completa
Sin inocular	De incoloro a beige claro, transparentes

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BBL CHROMagar Candida Medium (placas **Stacker** de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

Material no suministrado

Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación directa de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de todos los tipos de muestras clínicas. También puede utilizarse para el aislamiento de otros hongos (véase también **CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**).

Procedimiento de análisis

Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa. Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 20 – 48 h en posición invertida. Se requiere una incubación de 42 para que se desarrolle por completo el color de las colonias *Candida*. Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.

Ciertos aislados, tales como *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos, requieren una incubación más prolongada y posiblemente una temperatura de incubación inferior para obtener un crecimiento óptimo. Por tanto, debe inocularse e incubarse a 20 – 25 °C una placa con un segundo medio fúngico (por ejemplo **BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol**) si se prevé la presencia de hongos diferentes de la especie *Candida*.

Resultados

Después de la incubación, las placas de las muestras con hongos presentarán crecimiento. Se recomienda efectuar la lectura de las placas sobre un fondo blanco. Si están presentes especies de *Candida*, las colonias presentarán un color verde de claro a mediano (*C. albicans*), rosado claro a rosa con un borde blancuzco (*C. krusei*) o bien azul verdoso a azul metálico con o sin halos violetas (*C. tropicalis*). Otras especies de *Candida* y otras levaduras presentan un color malva de claro a oscuro (rosado a violeta) o, si no se utilizan sustratos cromógenos, presentarán su color natural de colonias (de crema a blanco).

Los datos de estudios diversos indican que no es necesario realizar pruebas de identificación adicionales para *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El uso de CHROMagar Candida Medium para la identificación directa de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* ha sido documentado en numerosos estudios que también pueden consultarse para obtener información adicional acerca de los procedimientos recomendados. Los resultados de una evaluación de rendimiento reciente de **BBL CHROMagar Candida Medium** fueron notificados por Jabra-Rizk y colegas.

Candida (Torulopsis) glabrata habitualmente produce colonias de color malva a malva oscuro en este medio². No obstante, se recomienda que los organismos que aparecen con este color se confirmen mediante pruebas bioquímicas adicionales, dado que este color de colonia puede ser producido por diversas especies de levaduras.

Las colonias que presenten un color de rosado pálido o malva claro a oscuro, o bien muestren su color crema natural en este medio, deben identificarse mediante métodos estándar.

Las levaduras diferentes de las especies anteriormente mencionadas y los hongos filamentosos también pueden aislarse en este medio si se incuban a una temperatura y durante un período apropiado para estos organismos.

Dado que los mohos y otros hongos filamentosos pueden metabolizar los sustratos cromógenos, los colores presentados por estos organismos en **BBL CHROMagar Candida**

Medium pueden ser diferentes de los mostrados en otros medios fúngicos. No utilizar el aspecto del crecimiento de los hongos filamentosos en este medio para su identificación morfológica tradicional.

Se ha informado que *C. dubliniensis* produce un color verde oscuro distintivo al realizar el aislamiento primario en **BBL CHROMagar Candida Medium**. Sin embargo, esta propiedad tal vez no se conserve en el subcultivo. Se requieren pruebas fenotípicas y genotípicas adicionales para la confirmación de *C. dubliniensis*.

Antes de utilizar **BBL CHROMagar Candida Medium** por primera vez, se recomienda practicar con el aspecto de colonia característico de cepas definidas de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, por ejemplo, las cepas mencionadas en **CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO**.

REFERENCIAS

1. Ásmundsdóttir, L. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15(6): p. 576-585
2. Barnett, S. (2014). *Equine Infectious Diseases*. 2° edición. 408-411
3. Bonifaz, Alexandro (2010). *Micología Medica Basica*. 3ª edición. Mc Graw Hill. Mexico, D.F., 279-302.
4. Criseo, G. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *Journal of Microbiological Methods*. 2015; 111: p. 50-56
5. De Bedout, C. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Revista Infectio*. 2010; 14(S2): p. S159-S171
6. Ells, R. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*?. *Mycoses*. 2009; 54: p. 1-16
7. Figueras, C. Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Anales de Pediatría*. 2011; 74(5): p. 337.e1-337.e17
8. Gamarra, S. *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* differentiation by colony morphotype in Sabouraud-triphenyltetrazolium agar. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2015; 32(2): p. 126-128
9. Gil-Alonso, S. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida Africana* by time-kill curves. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015; 82: p. 57-61
10. Hommel, R. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2° edición. 352-360
11. Khan, Z. A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 72: p. 285-287
12. Kiehn, T. *Candida dubliniensis*: An emerging pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2001; 23(11): p. 83-86
13. Lai, C. Catheter-related fungemia caused by *Candida dubliniensis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2013; 46: p. 306-308
14. Miceli, M. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: p. 142-151
15. Pasligh, J. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2010; 43(2): p. 147-154
16. Polke, M. *Candida* Survival Strategies. *Advances in Applied Microbiology*. 2015; 91: p. 139-235
17. Pozzatti, P. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal de Mycologie Médicale*. 2010; 20: p. 185-189
18. Quindós, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014; 31(1): p. 42-48
19. Razzaghi-Abyaneh, M. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *Journal de Mycologie Médicale*. 2014; 24: p. e43-e50

20. Sahand, I. Identificación rápida de *Candida dubliniensis* mediante la prueba Bichro-Dubli. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2007; 25(9): p. 576-578
21. Taweechaisupapong, S. Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. South African Journal of Botany. 2012; 78: p. 37-43
22. Wahab, A. High prevalence of *Candida dubliniensis* in lower respiratory tract secretions from cystic fibrosis patients may be related to increased adherence properties. International Journal of Infectious Diseases. 2014; 24: p. 14-19
23. Wang, X. Basic Genetics and Immunology of Candida Infections. 2016; 30: p. 85-102