



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Fenotipificación de aislados clínicos de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en tres medios diferenciales y su sensibilidad antifúngica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:

ANA LILIA MAGOS CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:  
M. EN C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA  
MANZANO GAYOSSO

2012

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Agradecimientos a las siguientes instituciones que participaron en este estudio.

Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado.

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud.

## **Agradecimientos**

Por su colaboración en la realización de esta Tesis a:

Dra. María de los Angeles Patricia Manzano Gayosso

Dr. Luís Javier Méndez Tovar

Dr. Ramón Fernández

Por su colaboración en la revisión de este manuscrito a:

Dra. María de los Angeles Patricia Manzano Gayosso

Dr. Luís Javier Méndez Tovar

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes

Dra. Maria Cristina Julia Pérez Reyes

## **Agradecimientos**

Esta tesis la dedico con todo mi amor a:

Mi abuelito Rutilio † porque esta tesis es un regalo prometido, lamentablemente Dios no nos dio la oportunidad de vivir juntos este momento, pero estoy segura de que te hubieras sentido muy orgulloso. Gracias por enseñarme de historia, matemáticas, español, etc., por ser el mejor abuelo del mundo, por cuidarme y consentirme. De ti aprendí que no hay límites en la vida y aunque sé que aún me falta aprender de tu diplomacia e inteligencia, no me rendiré...Te amo y con especial cariño es para ti este trabajo!

Mama Domi por tu amor, por haberme cuidado desde que nací, porque todos los momentos que he pasado a su lado los recuerdo con mucha alegría, tus abrazos, consejos, remedios, porque lo poco que tenías nos lo diste a manos llenas. Mama Domi te amo y admiro por todo lo que has logrado. Espero estés orgullosa de mi y de todo corazón te pido una disculpa por los momentos difíciles que te hice pasar. Te regalo este trabajo con todo mi corazón!

## **Agardecimientos**

A Dios por ser la Fe con la que me despierto cada día, por ser la luz que ilumina mi camino, por darme fuerza para seguir adelante, por regalarme vida, salud y amor.

A mi mamá por darme la vida, por ser mi mayor tesoro, por tu amor incondicional, por ser mi mejor amiga, por tus abrazos que fueron mi refugio cuando las cosas no marchaban bien, por confiar en mi, por ser mi ejemplo a seguir, por brindarme valores, por darme un regaño a tiempo, porque económicamente me brindaste mas de lo esencial, por tus consejos, por ser simplemente la mejor mamá del mundo. Te amo mucho!!!!

A Fer, gracias, por ser mi papá, por quererme y cuidarme. Siempre has sido incondicional para mi, por eso quiero agradecerte también que hayas sido mi técnico personal, arreglabas la computadora y solucionabas las fallas de Internet, luz, impresoras, etc., lamento haberte despertado varias noches. Gracias por todo!!!

A mis hermanas, gracias por su paciencia, por tolerarme en mis momentos de desesperación, por su amor, sus risas, su compañía ☺ .

A mi novio, Arturo Santiago por estar a mi lado desde hace seis años en este camino, por tu amor, por ser un amigo incondicional, por compartir tus alegrías y éxitos conmigo y ofrecerme un abrazo en los momentos difíciles, por apoyarme a lo largo de toda mi carrera, dándome consejos y brindándome ayuda moral, profesional y económica, convirtiéndose todo esto en un granito de arena en la construcción de este trabajo. Gracias porque todos los esfuerzos que hicimos han valido la pena y estoy segura que con esta constancia y ganas de salir adelante conseguiremos construir una vida juntos. IloveU osito!!!

A mi mejor amiga Lau, gracias porque desde el CCH has compartido conmigo alegrías, locuras, tragedias, etc., pero sobre todo has estado conmigo en los momentos más importantes de mi vida. Hemos aprendido a nadar contra la marea, sabiendo que nos tenemos la una a la otra, gracias nena!

Al profesor Alejandro, quien reforzó en mí el valor de la responsabilidad y las ganas de triunfar en la vida.

A la profesora Araceli Sosa por enseñarme lo maravillosa que es la biología y regalarme el amor por esta hermosa carrera.

A Norberto Magos, porque no todo fue tan malo, me quedo con los dulces debajo de mi almohada y los bailes en la sala. Gracias por estas dos frases: "Espacio que llevo prisa" y "No te preocupes, ocúpate" las cuales me repetía constantemente y me ayudaron en los momentos de desesperación.

## **Agradecimientos**

Gracias por abrirme las puertas del Laboratorio de Micología Médica, UNAM:

Con todo mi cariño y admiración a la Dra. Patricia Manzano Gayosso, que gracias a ella este trabajo ha sido posible. Le agradezco por haberme brindado la oportunidad de trabajar con usted ya que para mí es un gran honor. Gracias por haberme ayudado, aconsejado y ser más que una maestra para mí, no tengo palabras para agradecerle todo el apoyo que me dio en los congresos, en las clases en el laboratorio, por haberme tenido la confianza y por abrirme las puertas al campo de la micología. Con mi más grande afecto muchas gracias.

A todos los que son parte del laboratorio, por sus consejos, asesoría, apoyo y porque siempre recibí y aprendí cosas buenas de todos ustedes: Dr. Rubén López, Dra. Francisca Hernández, Elva, Erika, Blanca, Elda, Vero, Sol, Vivi, Rox, Amanda, Tania....Gracias porque sin sus aportaciones esta tesis no hubiera sido posible.

*Alébrate con los éxitos de los demás.*

*Hay suficiente para todos!!*

Lidia María Riba

## Índice

I. Antecedentes .....	12
I.1. Historia .....	12
I.2. Clasificación taxonómica .....	13
I.3. Género <i>Candida</i> .....	13
I.3.1. Morfología .....	13
I.3.1.1. Composición celular .....	16
I.3.2. Estudios fenotípicos de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	17
I.3.2.1. Pruebas no diferenciales .....	17
I.3.2.2. Pruebas diferenciales .....	17
I.4. Hábitat natural .....	21
I.5. Factores de virulencia .....	22
I.6. Epidemiología .....	24
I.7. Factores predisponentes .....	26
I.8. Formas clínicas .....	27
I.9. Antifúngicos .....	29
I.10. Resistencia antifúngica .....	31
I.11. Pruebas de sensibilidad antifúngica .....	33
II. Planteamiento del problema .....	35
III. Objetivos .....	37
III.1. Objetivos generales .....	37
III.2. Objetivos particulares .....	37
IV. Metodología .....	38
IV.1 Procedencia de los aislados .....	38
IV.2 Pacientes .....	38
IV.3 Identificación de las levaduras .....	38
IV.4 Pruebas fenotípicas no diferenciales .....	39
IV.5 Pruebas fenotípicas diferenciales .....	40
IV.6 Sensibilidad antifúngica .....	42
IV.7 Solución madre de antifúngicos .....	42

IV.8 Preparación de microplacas .....	42
IV.9 Preparación del inóculo .....	43
IV.10 Inoculación de las microplacas con cada uno de los antifúngicos .....	43
V. Resultados .....	45
VI. Discusión .....	58
VII. Conclusiones .....	63
Abreviaturas .....	64
Anexo .....	66
Bibliografía .....	71

### Índice de figuras

1. Blastoconidio. Proceso de gemación .....	14
2. Formación de pseudohifas en <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	15
3. Formación de tubo germinativo e hifas en <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	15
4. Clamidoconidios de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	16
5. Mecanismo de acción de los antifúngicos usados para el tratamiento de las micosis.....	31
6. Frotis del LLBA teñido con Gram .....	39
7. Levaduras ovals, tinción Gram .....	39
8. Pruebas fenotípicas no diferenciales .....	40
9. Inoculación de microplacas .....	43
10. Porcentaje de las formas clínicas de candidosis observada en 135 pacientes .....	45
11. Especímenes biológicos procesados de 135 pacientes .....	46
12 y 13. Colonias de <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. albicans</i> en AT .....	49
14. Colonias de <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. albicans</i> en AS .....	50
15. Clamidoconidios únicos sobre una hifa larga de <i>C. albicans</i> .....	50
16. Clamidoconidios abundantes en racimo sobre una hifa corta de <i>C. dubliniensis</i> .....	50

17. Placas de APD incubadas a 45° C .....	51
18. Porcentaje de aislados obtenidos de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	51
19. Asociación de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> en CHROMagar <i>Candida</i> ® .....	53
20. Actividad de los 8 antifúngicos sobre los 91 aislados estudiados .....	56
21. Porcentaje de resistencia en los 91 aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	56
22. Comparación entre la resistencia de los aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	57

### Índice de cuadros

1. Diversas pruebas diferenciales entre <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	18
2. Datos epidemiológicos de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> en diferentes países .....	26
3. Proporción de aislamientos de <i>C. albicans</i> en cavidad bucal y la relación con diferentes factores predisponentes .....	27
4. Microbiota normal del humano en diversas regiones anatómicas y su interacción con <i>Candida</i> .....	28
5. Manifestaciones de algunas formas clínicas de candidosis causadas por <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	28
6. Resistencia de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> a los diferentes antifúngicos .....	32
7. Criterios para la identificación por pruebas diferenciales a <i>C. albicans</i> y <i>C.</i> <i>dubliniensis</i> .....	41
8. Antifúngicos, solvente e intervalo de concentración final distribuidos en las microplacas .....	42
9. Puntos de corte establecidos por el CLSI de sensible, sensible dosis dependiente y resistente para levaduras del género <i>Candida</i> .....	44
10. Relación de las principales formas clínicas de candidosis y el factor predisponente .....	46
11. Aislados de <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i> obtenidos de pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México .....	47

12. Criterios morfológicos observados en las colonias de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> en tres medios diferenciales (AT, AS y ACM) .....	48
13. Aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> obtenidos de los pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México .....	51
14. Asociación entre los aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> con otras especies de <i>Candida</i> no <i>albicans</i> , forma clínica y factor predisponente .....	52
15. Concentración mínima inhibitoria de aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> .....	53

## I. Antecedentes

### I.1 Historia

Las primeras descripciones de *Candida* spp como causante de infección en el humano estuvieron relacionadas con las manifestaciones clínicas presentadas en recién nacidos enfermos. A Hipócrates (377 a.c.) se le atribuyó el primer reporte, el cual apareció en su obra "Epidemics", donde detalló las lesiones en la boca de un recién nacido como aftas (*aphtay*, en griego) o úlceras en la mucosa. La etiología fúngica fue inicialmente descrita por Berg (1941) y Gruby (1942) <sup>1</sup>. Este último continuó los estudios de la morfología y fermentación de los microorganismos levaduriformes, los cuales fueron publicados en 1946 <sup>38</sup>. Por otro lado, Robin (1853) acuñó el primer nombre binomial de esta levadura como *Oidium albicans*, modificado más tarde por Zopf (1890) como *Monilia albicans*, este nombre fue utilizado ampliamente por varias décadas hasta la descripción del género *Candida* por Berkhout en 1923. Al estudio de este género se introdujeron 121 especies que en la actualidad son consideradas sinónimos de *Candida albicans*, de acuerdo con Barnett y cols <sup>11</sup>. Esta especie fue presentada formalmente y aceptada oficialmente en 1954 en el VIII Congreso de Botánica <sup>90</sup>, <sup>60</sup>.

Desde los años 60's se identificaron algunas variaciones en la morfología colonial en los aislados de *C. albicans* <sup>14</sup> y otras con características atípicas <sup>90</sup> y alteraciones en la sensibilidad a fluconazol <sup>109</sup>. Ante este hallazgo se separaron los aislados atípicos y se renombraron como una nueva especie, denominada *Candida dubliniensis*; identificada por Sullivan en 1995, quien obtuvo por primera vez un aislado a partir de la boca de un paciente con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en Dublín, Irlanda, razón por la cual se denominó "*dubliniensis*" <sup>18</sup>. Sullivan tomó en cuenta distintos criterios para distinguir a *C. dubliniensis* de los aislados de *C. albicans* como la producción de clamidoconidios, crecimiento a diferentes temperaturas, filamentación en suero y estudios genotípicos <sup>108</sup>.

## **I.2. Clasificación Taxonómica**

La clasificación taxonómica fue tomada de la revisión de Mitchel T <sup>67</sup>. Ésta se basó en las características morfológicas, fisiológicas y reproducción telomorfa.

**Reino** Eumycota

**Phylum** Ascomycota

**Clase** Hemyascomycetes

**Orden** Saccharomycetales

**Familia** Candidacea

**Género** *Candida*

**Especie** *C. albicans*

*C. dubliniensis*

## **I.3. Género *Candida***

Levadura, viene del latín *levar* que significa levantar o elevar; son hongos unicelulares, sus células son pequeñas y de diversas formas. *Candida* proviene del latín *candidus* que significa blanco <sup>116</sup>.

De acuerdo con diversas revisiones en el género *Candida* se han identificado aproximadamente 200 especies, y son alrededor de diez las que con mayor frecuencia causan infección en el humano, como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* <sup>109,90,49</sup>. Para los fines de este trabajo solo se describirán los aspectos relacionados con *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

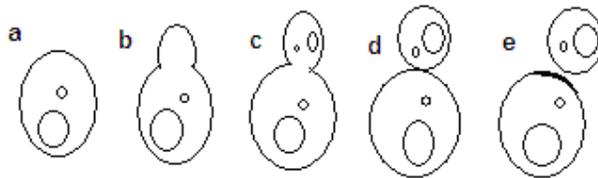
### **I.3.1 Morfología**

*Candida albicans* y *C. dubliniensis* son dos especies fenotípicamente similares sus características morfológicas serán tratadas a continuación.

Macroscópica: las colonias generalmente son lisas y algunas veces rugosas, blandas, brillantes, en ocasiones cerosas, color blanco y esporádicamente a simple vista se puede observar micelio alrededor de la colonia <sup>25</sup>.

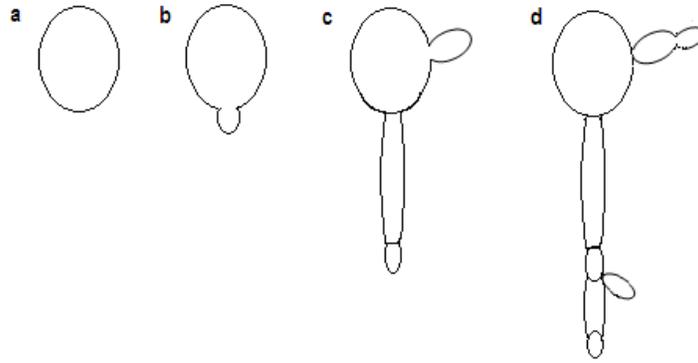
Microscópica: estas especies se caracterizan por presentar diversas estructuras.

A) Blastoconidio, el cual tiene un desarrollo tipo blástico; este consiste en la formación de una gema producida por el abultamiento y ensanchamiento en una porción de la pared celular de la célula madre. La gema aumenta de tamaño, el núcleo se divide y migra; al formarse completamente la célula hija se forma un septo en el istmo, entre la célula madre y la hija. La célula recién formada se separa dejando una cicatriz (Figura 1) <sup>49,11</sup>. Los blastoconidios miden entre 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro; son de forma globosa, ovoide, cilíndrica, corta o alargada, claviforme, triangular, con los extremos redondeados y algunas veces son de formas irregulares <sup>51</sup>.



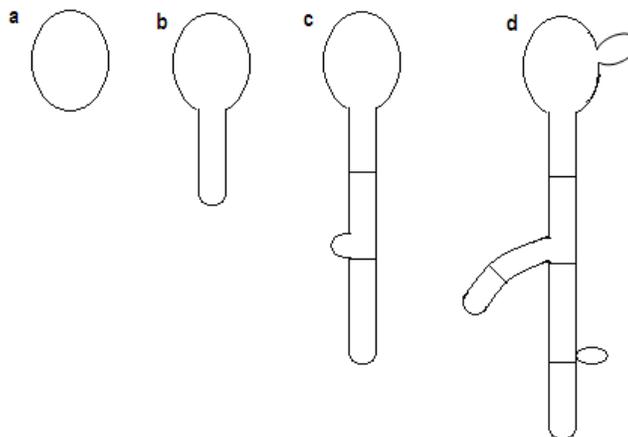
**Figura 1.** Blastoconidio. Proceso de gemación: a) Célula madre, b) Ensanchamiento de la pared celular, c) División celular, d) Formación del septo, e) Desprendimiento de la célula hija y cicatrización en la célula madre.

B) Pseudohifa, se origina de la célula levaduriforme o a partir de la hifa por gemación, donde la nueva célula se alarga y permanece unida a la célula madre, resultando la formación de una pseudohifa con constricciones entre los distintos compartimentos celulares. El sitio donde ocurre la mitosis es en el cuello de la célula madre (Figura 2) <sup>17, 125</sup>.



**Figura 2.** Formación de pseudohifas en *C. albicans* y *C. dubliniensis*: a) Célula madre, b) Ensanchamiento de la pared, c) Formación de la pseudohifa, d) Ramificación de la pseudohifa.

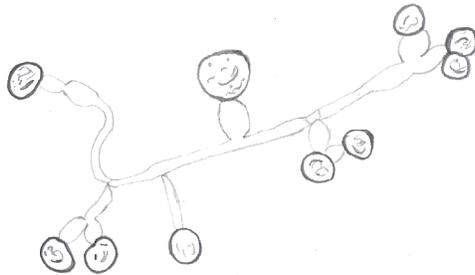
C) Hifa, esta estructura se produce a partir de la levadura o por ramificación de una hifa existente; se inicia con el desarrollo de un tubo germinativo, el cual crece por extensión apical y posterior formación de un septo. La ramificación ocurre lateralmente justo antes del septo, por lo que, este último es perpendicular al eje principal de la hifa. La hifa y el tubo germinativo no muestran constricciones, por lo cual las paredes son paralelas al septo. La mitosis ocurre totalmente dentro del tubo germinativo (Figura 3) <sup>17, 125</sup>.



**Figura 3.** Formación de tubo germinativo e hifas en *C. albicans* y *C. dubliniensis*: a) Célula madre, b) Formación de tubo germinativo, c) Formación de la hifa, d) Ramificación de la hifa.

D) Clamidoconidios, son células que se forman por un desarrollo tálico; de pared gruesa, voluminosa y refractante. El conidio se origina a partir de la transformación de una célula ya existente en una hifa o en un conidióforo (Figura 4). El término clamidoconidio tiene una connotación funcional, ya que se cree que es una estructura de resistencia, capaz de sobrevivir por largos periodos cuando las condiciones del medio no son favorables, por ejemplo falta de nutrientes, cambios de temperatura y pH <sup>49, 125</sup>.

*Candida albicans* y *C. dubliniensis* producen clamidoconidios, observados comúnmente *in vitro* en medios pobres en nutrientes, éstos pueden crecer solitarios, en pares, tripletes o racimos sobre su célula suspensora <sup>17</sup>.



**Figura 4.** Clamidoconidios de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Aún no se conoce la fase telomorfa de *C. albicans* y *C. dubliniensis* <sup>26</sup>.

#### 1.3.1.1 Composición celular

La pared celular está constituida principalmente de mananas,  $\beta$ -glucanas y de quitina, esta última representa el 3 al 6% de peso seco de la pared <sup>82</sup>. La pared celular le da a la levadura su forma característica, finalmente sus componentes al ser proteínas y polisacáridos se comportan como antígenos que originan una respuesta inmune específica en el hospedero <sup>76</sup>.

Por debajo de la pared celular se encuentra la membrana plasmática, que está integrada por fosfolípidos y proteínas. La membrana plasmática es rica en sistemas enzimáticos, uno de ellos es el citocromo P450, su funcionamiento esta

ligado a la síntesis de ergosterol, que es el principal esteroide de la célula fúngica y con frecuencia representa una diana utilizada por fármacos antifúngicos <sup>76</sup>.

### I.3.2 Estudios fenotípicos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

En los aislados de *C. albicans* se han descrito dos serotipos (A y B), reconocidos por el componente de manano en su pared. El serotipo A está relacionado antigénicamente con *C. tropicalis*, y el B con *C. albicans* <sup>17</sup>. Las características fenotípicas son variables, el A muestra colonias rugosas, mientras que en el B son lisas <sup>19</sup>. Otra diferencia es la sensibilidad a la 5-fluorocitosina que se presenta solo en el serotipo A, mientras que las colonias serotipo B son resistentes a este fármaco <sup>100</sup>. Para la determinación de los serotipos en *C. albicans* se utiliza la aglutinación en antisuero con anticuerpos de clase IgG, dirigidos contra el antígeno 6 de la pared celular del serotipo A; las cepas que presentan aglutinación son clasificadas como serotipo A y las negativas como serotipo B <sup>101</sup>.

#### I.3.2.1 Pruebas no diferenciales

Inicialmente la identificación de *C. albicans* se basaba en tres criterios: 1) la producción de clamidoconidios en agar harina de maíz adicionado con el tensoactivo Tween 80 al 1%; 2) formación de tubo germinativo en suero; 3) la resistencia a la cicloheximida <sup>11,54,53</sup>.

#### I.3.2.2 Pruebas diferenciales

El fundamento depende de la prueba, en los medios cromógenos es por la actividad de enzimas; la producción de clamidoconidios en diversos medios de cultivo; la formación de tubo germinativo; la asimilación de algún carbohidrato; tolerancia a la temperatura y a los medios hipertónicos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Diversas pruebas diferenciales entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Autor	Año	Medio de cultivo	Criterio	# Muestras	
				C. a	C. d
Sullivan, Coleman <sup>108</sup>	1998	Agar papa dextrosa a 42-45 °C	Crecimiento colonial	1	3
Slifkin M <sup>104</sup>	2000	Agar-Tween 80 al 1% y CaCl <sub>2</sub> al 0.1%	Opacidad alrededor de la colonia	15	16
Al Mosaid y cols <sup>2</sup>	2001	Agar ácido cafeico-citrato férrico	Clamidoconidios; superficie rugosa en <i>C. dubliniensis</i>	166	130
Staib, Arastéh <sup>107</sup>	2001	Agar Staib "alpiste negro"	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	1	
Mosca y cols <sup>71</sup>	2002	Agar caseína	Clamidoconidios	120	109
Al Mosaid y cols <sup>3</sup>	2003	Agar Pal "semilla de girasol"	Halo velloso	124	128
Khan y cols <sup>44</sup>	2004	Agar tabaco	Clamidoconidios; superficie rugosa en <i>C. dubliniensis</i>	50	30
Sahand y cols <sup>94</sup>	2005	CHROMagar <i>Candida</i> + agar Pal	Clamidoconidios y color	30	100
Khan y cols <sup>46</sup>	2005	Agar cáscara de semilla de girasol	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	10	40
Loreto y cols <sup>55</sup>	2006	Agar semilla de ajonjolí	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	100	26
Loreto y cols <sup>55</sup>	2006	Agar linaza	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	100	26
Alves y cols <sup>6</sup>	2006	Agar tomate zanahoria	Clamidoconidios	93	26
Eraso y cols <sup>30</sup>	2006	<i>Candida</i> ID2 (CAN2)	Color	100	100
Loreto y cols <sup>56</sup>	2008	Agar extracto rosemary "romero"	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	100	30
Loreto y cols <sup>56</sup>	2008	Agar extracto de orégano	Clamidoconidios; superficie rugosa y halo velloso en <i>C. dubliniensis</i>	100	30
Scheid y cols <sup>98</sup>	2010	Agar DRBC: Agar rosa bengala + cloranfenicol + diclorán	Clamidoconidios; superficie rugosa en <i>C. dubliniensis</i>	103	27
Silveira y cols <sup>102</sup>	2011	Caldo Sabouraud hipertónico	Crecimiento colonial	79	
Khan y cols <sup>45</sup>	2012	Agar xilosa	Crecimiento colonial	NE	NE

C. a: *Candida albicans*, C.d: *Candida dubliniensis*. NE: no especificado

Medios cromogénicos, CHROMagar *Candida*<sup>® 77</sup>, cuyo fundamento se basa en la actividad de la enzima hexosaminidasa, considerados medios para diferenciar a *C. dubliniensis* de *C. albicans*; después de la incubación a 37 °C durante 48 h, por el crecimiento de colonias de color verde claro se identifica a *C. albicans* y por colonias verde oscuro a *C. dubliniensis*<sup>108</sup>. Sin embargo, en la actualidad es difícil la diferenciación únicamente por la coloración verde en este medio. Recientemente se han introducido otros medios cromógenos (Agar cromogénico Oxoid, *Candida* ID2<sup>®</sup> (CAN2), Brilliance<sup>™</sup> *Candida*) con la finalidad de resolver esta incógnita, sin éxito.

Producción de clamidoconidios, se han empleado diversos medios de cultivo, en la mayoría de ellos, el fundamento principal es la formación de clamidoconidios en los aislados de *C. dubliniensis*, mientras que en *C. albicans* son escasos o ausentes. La mayoría de los medios están adicionados con escasos nutrientes y tienen un pH ácido. Algunos autores han tomado en cuenta la morfología macroscópica, principalmente la superficie rugosa para identificar a *C. dubliniensis*, a diferencia de las colonias de *C. albicans* que son lisas<sup>107,44,56,55</sup>.

Formación de tubo germinativo, en agar Mueller-Hinton, donde *C. dubliniensis* produce numerosos tubos germinativos, después de dos horas de incubación a 37 °C<sup>89</sup>.

Asimilación de carbohidratos, D-xilosa, se realiza una suspensión en 0.5 mL de solución salina al 0.85%, a partir de un crecimiento de 24 h en agar dextrosa Sabouraud (ADS), se prepara un inóculo a una concentración al 2 de McFarland, se añade una tableta de D-xilosa Rosco<sup>®</sup> y se incuba a 37 °C durante 3 horas. El viraje amarillo indica la asimilación de esta azúcar; *C. albicans* tiene la capacidad de asimilar D-xilosa, mientras que *C. dubliniensis* no<sup>33</sup>.

Termotolerancia, la prueba se hace en agar papa dextrosa (APD) para promover el crecimiento a 42 °C<sup>80</sup> y 45 °C, durante 48 h de incubación, los aislados de *C. albicans* crecen a ambas temperaturas y *C. dubliniensis* con crecimiento escaso o nulo a 45 °C<sup>11,108</sup>.

Prueba de opacidad, al medio se le adiciona Tween 80 al 1% y CaCl<sub>2</sub> al 0.1% para estudiar la actividad lipolítica de la levadura. La prueba es positiva

cuando se forma un halo de opacidad alrededor de la colonia, por la precipitación de las sales cálcicas de los ácidos grasos libres alrededor de las colonias de *C. albicans*, mostrado por la formación de un halo opaco a las 72 h y en *C. dubliniensis* ausencia del halo <sup>104</sup>.

Aglutinación en látex (Bichro-Dubli Fumouze®), esta prueba utiliza un látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal 12F7-F2 que reacciona con un antígeno específico de la superficie de la pared celular de *C. dubliniensis*; cuando la prueba es positiva las partículas de látex aglutinadas forman un anillo azul en la periferia y el centro de color rosado. Esta prueba tiene una sensibilidad del 97.8 al 100% <sup>64,94</sup>.

Debido a la variación observada en las pruebas fenotípicas entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, en 1995 se introdujeron las pruebas moleculares para diferenciar estas especies. Las pruebas fueron variadas e incluyeron las sondas específicas de DNA, patrones electroforeticos de DNA, perfiles de expresión génica de RNA, análisis de enzimas de restricción, "Polymerase Chain Reaction" y "Random Amplified Polymorphic DNA" <sup>101</sup>.

El genoma de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fue secuenciado usando "Whole genome shotgun", en 2004 por Jones y cols <sup>42</sup> y en 2009 por Jackson y cols <sup>41</sup>. También en ambas especies se han descrito los genes comunes que codifican sobre algunos factores de virulencia, principalmente en la formación de hifas, la producción de aspartilproteinasas (SAP) y los genes ALS que están involucrados en el proceso de adhesión <sup>41</sup>.

Por la tipificación de cariotipos se describió el numero de cromosomas de *C. albicans* (8 pares de cromosomas, de los cuales 7 presentaron tamaño constante y uno fue polimórfico, con tamaño de 3.2 a 4Mb) <sup>100,42</sup> y de *C. dubliniensis* (8 cromosomas, de los cuales 5 son haploides (II, VI, VIII, IX y XII) y 3 diploides (III, VII y XIII)) <sup>41</sup>.

Jackson y cols <sup>41</sup> describieron la similitud en la secuencia del genoma y las diferencias en la expresión génica de algunas de las familias de genes TLO de factores de transcripción, los cuales están involucrados en la virulencia; y la familia de genes IFA que se considera una adaptación específica al parasitismo

de *Candida*. La diferencia en estas dos familias de genes observada en *C. dubliniensis* ha sido la pérdida de algunos de los genes involucrados en el crecimiento de la hifa y como consecuencia en la virulencia; es decir, esta especie comparte un ancestro en común con *C. albicans* y aparentemente ha experimentado una reducción en la evolución, con disminución en el repertorio de genes heredados. En cambio, *C. albicans* ha perdido menor número de genes y ha expandido su repertorio genómico, con la adquisición evolutiva de otros como SAP4 y SAP5 a través de inversión y por duplicación ALS3. Sin embargo la familia de genes TLO se destaca por tener un número de copias más grande, de tal manera que *C. albicans* sigue siendo la especie patógena más frecuente en comparación con *C. dubliniensis*.

Otra de las evidencias del análisis genómico en estas dos especies es la predicción de los genes involucrados en el crecimiento del hongo y la identificación de dianas específicas para los fármacos antifúngicos y que de como resultado una disminución de los efectos secundarios para el paciente <sup>32</sup>.

La "Major Repeat Sequence" es una característica específica de los genomas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* la cual contribuyó a la variación en el cariotipo en estas especies, actuando como "punto caliente" para la translocación cromosómica <sup>50</sup>. La disponibilidad de la secuencia genómica completa ha facilitado el estudio de los antifúngicos, al desarrollar un método que combina la inhibición antisentido del RNA y la interferencia del promotor para identificar los genes específicos involucrados en el crecimiento de *C. albicans* <sup>25</sup>. Estos genes fueron empleados para el desarrollo de nuevas moléculas antifúngicas <sup>32</sup>.

#### **1.4 Hábitat natural**

*Candida albicans* y *C. dubliniensis* se han recuperado de diferentes hábitats, como agua, suelo, restos de plantas y animales, líquidos fermentados, alimentos lácteos y son comensales en diversas regiones corporales en el humano y en los animales, principalmente del tracto gastrointestinal, urogenital, piel y uñas.

Por ejemplo, en huertos utilizados para la crianza de cerdos en Costa Rica, cuando se construyen porquerizas con piso de cemento se forman charcos en los que se multiplican microorganismos que infectan a los cerdos, entre ellos *Candida albicans*, la cual causa problemas de "pododermatitis" <sup>52</sup>.

Por otro lado, Luna en el 2004 en Michoacán, México aisló el 34.8% de levaduras de la leche de vacas con mastitis, de las cuales el 1.1% correspondió a *Candida albicans* <sup>59</sup>.

En individuos sanos, *C. albicans* es comensal de diversas regiones corporales, es parte de la microbiota normal del aparato gastrointestinal, mucosa bucal (31-55%), mucosa vaginal (13%), así como también de la piel periorificial (25-50%) <sup>119</sup>. Por el contrario, *C. dubliniensis*, se presenta en el 3% de la microbiota de la mucosa bucal y la prevalencia en la mucosa vaginal es del 1% <sup>23,83,113,65</sup>.

### **I.5 Factores de virulencia**

El proceso de colonización e invasión del tejido por *C. albicans* y *C. dubliniensis* es por la interacción de varios de los factores de virulencia y el epitelio:

1. Adhesinas, estas proteínas se han identificado como manoproteínas y mananas que ayudan a la adhesión de la levadura en diferentes sustratos <sup>122,123</sup>.
2. Enzimas proteolíticas, descrita como aspartil-proteasa, que facilita la penetración inicial a los queratinocitos <sup>17</sup>.
3. Fosfolipasas, enzimas capaces de hidrolizar glicerofosfolípidos, cuyo blanco de acción es la membrana de las células del epitelio, facilitando la penetración de la hifa <sup>78,87</sup>.
4. Dimorfismo, de levadura a hifa, que ayuda en la evasión del sistema de defensa del hospedero, debido a que ambas formas pueden contribuir en el establecimiento y progresión de la enfermedad. Se considera que la hifa puede promover la invasión de tejidos, mientras que la levadura puede promover la diseminación <sup>17</sup>.
5. Adaptación al pH del microambiente por la capacidad de tolerar cambios por medio de dos genes PHR1 y PHR2, los cuales se encienden o apagan según la variación del pH. Por ejemplo, el primero se activa en pH alcalino y se inactiva en medio ácido <sup>97,72</sup>.

6. Biopelículas, son comunidades de microorganismos, unidas a una superficie, rodeadas por una matriz extracelular polimérica. La biopelícula madura es una comunidad de microorganismos irreversible, la cual exhibe diferentes propiedades fenotípicas, como la alta resistencia a fármacos <sup>48</sup>. En *C. albicans* y *C. dubliniensis* se ha demostrado la capacidad que tienen de formar microcolonias de levaduras e hifas distribuidas en una bicapa en la superficie de catéteres <sup>28</sup>. Esta capacidad de formación de biopelículas se presenta también en prótesis dental, válvulas cardíacas, dispositivo intrauterino y en los epitelios <sup>121</sup>.

La formación de biopelículas ocurre en tres fases: temprana, intermedia y de maduración. Inicia con los blastosconidios adheridos a una superficie y finaliza con la formación de comunidades celulares bien definidas rodeadas por la matriz de polisacáridos <sup>20</sup>.

La formación de biopelículas por *C. albicans* y *C. dubliniensis* provocan que sean menos sensibles al tratamiento con antifúngicos, incrementando la colonización. Se ha reportado que la producción de biopelículas es significativamente mayor en *C. albicans* en comparación con *C. dubliniensis* <sup>10,121</sup>.

7. Cambio fenotípico blanco-opaco. En 1985 y 1986 Soll y cols <sup>105</sup> describieron el llamado "cambio fenotípico blanco-opaco (W-O)" en cepas de *C. albicans* WO-1 aisladas de sangre de un paciente con infección sistémica <sup>17</sup>. Esta descripción hace alusión al cambio reversible entre dos estados heredables conocidos como blanco y opaco <sup>36</sup>.

Las colonias blancas y opacas son fácilmente distinguibles por su morfología: en la fase blanca, las colonias son lisas, semiesféricas; mientras que en la fase opaca, las colonias son grisáceas, lisas y planas. Éstas son inestables y poco virulentas en infecciones sistémicas, pero persistentes y virulentas en infecciones superficiales <sup>17,36</sup>.

Este fenómeno ocurre espontáneamente en ambas direcciones, es decir, al sembrar colonias blancas es posible que estas crezcan opacas y viceversa. Este cambio afecta drásticamente el fenotipo celular así como al fenotipo de la colonia.

La variedad de características fenotípicas resultantes con base al cambio blanco-opaco, están reguladas por diversos genes encargados de expresar determinado fenotipo. Algunos descritos en la fase blanca son WH11, CDR4, EFG1-3.2t, HOS3-2.5t y GPM1; mientras que en la fase opaca son OP4, PEO1, SAP3, CDR3, EFG1, PFK2, NOS1, NIK1 y HOS3-2.3t<sup>17</sup>.

Sullivan y cols<sup>110</sup> reportaron que los aislados de *C. dubliniensis* son menos patógenos que los de *C. albicans*, debido a la menor virulencia, a pesar de producir hifas, ya que es más susceptible al estrés del microambiente, a las temperaturas altas, a las concentraciones de NaCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **I.6 Epidemiología**

Mundialmente se considera que *C. albicans* es la principal especie causante de candidosis, tanto superficial como profunda (40-90%). La incidencia de esta infección ha aumentado en los últimos 30 años; constituye el 7.4% de todas las micosis y el 25% de las micosis superficiales<sup>7,110,15</sup>. En el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica se reportó, que la candidosis urogenital se considera una enfermedad de transmisión sexual y es la responsable de la vulvovaginitis que representa del 20 al 30% de las enfermedades ginecológicas. En México " en el año 2003 la candidosis urogenital ocupó el doceavo lugar con 360 874 casos y una incidencia de 346.3 por 100 000 habitantes; para el año 2008 el catorceavo lugar con 295 914 casos y una incidencia de 277.38"<sup>29</sup>.

En las formas cutáneo-mucosas, las mucosas están afectadas en el 20%, la piel en el 30% y las uñas en el 35%; mientras que la candidosis invasiva, siendo la mas frecuente en unidades de cuidados intensivos, provoca alta mortalidad en los pacientes (30-80 %) <sup>119,86,31</sup>. En la candidosis bucal, *C. albicans* se aísla en 2 al 42%. De la mucosa vaginal en el 3-68%, de colon en el 70%, de faringe en el 35% y de tracto gastrointestinal de 1-55%.

A pesar que *C. albicans* es la especie más frecuente de candidosis, en el 2004 en Argentina y 2006 en Paraguay detectaron que ésta fue reemplazada por otras especies de *Candida* no *albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C.*

*parapsilosis*) en una proporción del 40% a 54.9% y 41% a 47%, respectivamente <sup>96,73</sup>.

La frecuencia de aislamientos de esta especie varía según la forma clínica de candidosis, por ejemplo, en muestras de sangre la principal especie fue *C. parapsilosis* (34.9%), seguida de *C. albicans* (30.2%). En exudado de mucosas *C. albicans* se aisló en el 60%-80% de los casos; en infecciones del tracto urinario causadas por levaduras, esta especie se presentó en el 47.7% <sup>73</sup>.

Por el contrario, *C. dubliniensis* es una especie comúnmente asociada a cavidad bucal en pacientes infectados con VIH y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). De acuerdo a las diversas publicaciones y a los factores de riesgo, ha sido reportada en la cavidad bucal de pacientes con VIH del 3.5 al 34%. Recientemente en la India se realizó un estudio en 132 pacientes portadores de VIH, donde consideraron una prevalencia del 16.3%. Chunchanur y cols <sup>21</sup> establecieron que esta especie es causante de candidosis bucal en el 16-32%, mientras que Sullivan reportó una frecuencia del 1.5-32% <sup>109</sup>. Esta especie también ha sido relacionada con diversos factores de inmunosupresión, diabetes mellitus, fibrosis quística y en estomatitis por el uso de dentadura. Finalmente en candidemias en el 2% <sup>99,47</sup>.

De acuerdo con el estudio realizado por Sahand y cols (2005) <sup>94</sup>, consideraron que *C. dubliniensis* representa el 3.3% de los aislados identificados inicialmente como *C. albicans*. En los años 90's se presentó un incremento en la incidencia de las infecciones causadas por esta especie, debido a la disminución en la sensibilidad a fluconazol. A partir de este hecho, aumentó el interés por la identificación y la diferenciación de los aislados de *C. albicans* <sup>18</sup>. Es común encontrar a *C. dubliniensis* asociada con otras especies, sin embargo aproximadamente en el 10% es la única especie causante de la candidosis.

En el cuadro 2 se recopilan datos epidemiológicos de diversos estudios realizados en varios países.

**Cuadro 2.** Datos epidemiológicos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en diferentes países.

Autor	Año	País	Aislados totales	Localización	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>	
					Aislados	%	Aislados	%
Ceballos y cols <sup>19</sup>	1998	España	50	Cavidad bucal	44	88	4	8
Slavin <sup>103</sup>	2002	Australia	361	Sangre	206	56	-	-
Silva y cols <sup>101</sup>	2003	Chile	47	Sangre	46	98	1	2
Mosca y cols <sup>70</sup>	2005	España	12	Prótesis bucal y mucosa palatina	9	75	1	8
Handog <sup>37</sup>	2005	Filipinas	26	Cavidad bucal y uñas	11	42	-	-
Pirottal <sup>81</sup>	2006	Australia	59	Vaginal	43	73	-	-
Sahand y cols <sup>95</sup>	2006	España	135	Pulmonar, ótica, urinaria, cutánea, orofaríngea, genitales, esofágica, peritoneal, absceso, punta de catéter y sangre.	131	97	4	3
Pineda y cols <sup>80</sup>	2008	Argentina	212	Orofaringea, urinaria, pulmonar, vaginal y uñas	199	94	13	6
Prieto <sup>84</sup>	2008	México	97	Cavidad bucal	89	92	-	-
García <sup>34</sup>	2010	México	100	Pulmonar	96	96	4	4
Villarroel <sup>120</sup>	2011	Bolivia	103	Vaginal	64	62	-	-
Manzano y cols <sup>62</sup>	2011	México	166	Uñas	53	32	2	1

### I.7 Factores predisponentes

La candidosis afecta a individuos de cualquier grupo étnico, género y en los extremos de la edad (niños y ancianos), principalmente en individuos que presentan algún factor de inmunosupresión. En general es una asociación de dos o más factores y se divide de acuerdo a la localización anatómica y a la forma clínica de la candidosis. Por ejemplo, la candidosis bucofaringea está relacionada con el uso de prótesis dental<sup>54</sup>, la vulvovaginitis al usar anticonceptivos y en el embarazo; en la candidosis cutánea son maceración por

humedad, heridas o manicura; la candidosis esofágica en pacientes con VIH o SIDA, por el uso de esteroides sistémicos o trasplante de órganos; en la candidosis pulmonar, con frecuencia los pacientes adultos presentan algún trastorno como leucemia, linfoma o alguna enfermedad respiratoria grave, mientras que en los recién nacidos, lactantes y los infantes con fibrosis quística son más susceptibles a padecer esta micosis <sup>90</sup>. En la localización ocular los factores predisponentes son por traumatismo causado por material extraño o lentes de contacto y cirugía; finalmente en las infecciones del tracto uterino por lo general el uso de sondas y/o catéter urinario.

La frecuencia de aislamiento de *C. albicans* en la boca es menor como colonizante y se incrementa cuando causa infección. En el cuadro 3 se muestra la diferencia en el porcentaje de aislamiento de *C. albicans* de cavidad bucal y los diferentes factores predisponentes con o sin manifestaciones clínicas. Con respecto a los aislados de *C. dubliniensis* se conoce poco, aunque Pontón y cols <sup>82</sup> reportaron en pacientes VIH y SIDA el 18% y 25% en la forma asintomática y un incremento del 26% y 32% en su forma sintomática, respectivamente.

**Cuadro 3.** Proporción de aislamientos de *C. albicans* en cavidad bucal y la relación con diferentes factores predisponentes.

Factor predisponente	Asintomático (%)	Sintomático (%)
VIH <sup>118</sup>	72	28
SIDA <sup>84</sup>	38	62
Diabetes mellitus <sup>126</sup>	30	47
Prótesis <sup>82</sup>	10-34	60
Cáncer y tratamiento <sup>79</sup>	43-75	17-52

### I.8 Formas clínicas

*Candida* como comensal en las diferentes áreas anatómicas está en equilibrio con otros microorganismos y el microambiente del cuerpo humano (Cuadro 4) <sup>112</sup>, pero cuando éste se pierde por dietas ricas en azúcares, cambio de pH, temperatura y disminución de la respuesta inmune, pasa a su estado patógeno causando candidosis. De las infecciones por hongos, las causadas por *Candida* spp son de las más comunes y con diversas formas clínicas <sup>114</sup>.

**Cuadro 4.** Microbiota normal del humano en diversas regiones anatómicas y su interacción con *Candida*.

Localización	Microorganismo
Boca	<i>Peptostreptococcus</i> spp
	<i>Lactobacillus</i> spp
	<i>Neisseria</i> spp
Colon	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus</i> spp
	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides melaninogenicus</i> , <i>Bacteroides oralis</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Peptostreptococcus</i> spp
Vagina	<i>Lactobacillus</i> spp
Piel	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Acinetobacter</i> spp

La candidosis es una infección que puede presentar manifestaciones superficiales o sistémicas. La evolución puede ser aguda, subaguda o crónica. Las formas clínicas dependen de la localización anatómica (Cuadro 5). Las publicaciones de las infecciones causadas por *C. albicans* son múltiples, solo algunas relacionadas con *C. dubliniensis* <sup>19,70,80,101,23</sup>.

**Cuadro 5.** Manifestaciones de algunas formas clínicas de candidosis causadas por *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Candidosis		Manifestación
Candidosis superficial	Bucal	Placas blanquecinas, adherentes, pseudomembranosas, dolorosas, dispuestas sobre el epitelio eritematoso <sup>54</sup> .
	Vulvovaginitis	Placas blanquecinas o amarillentas, pseudomembranosas, eritema, leucorrea espesa y grumosa, prurito intenso, puede haber dispareunia <sup>9</sup> .
	Onicomycosis	Uñas despulidas, estrías transversales, onicólisis, diversas coloraciones (blancas, verdosas, marrón), paroniquia (inflamación, edema, dolor y exudado alrededor de la uña) <sup>54</sup> .

Candidosis		Manifestación
Candidosis sistémica	Ocular *	Placas algodonosas, uveítis, conjuntivitis, algunas veces pérdida de la visión <sup>6</sup> .
	Esofagitis *	Placas blanquecinas, disfagia, náuseas, vómito y dolor retroesternal <sup>54</sup> .
	Pulmonar	Tos, fiebre ligera, sudoración nocturna, disnea, pérdida de peso y producción de esputo mucoso. En infecciones graves, las lesiones son microabscesos o áreas necróticas <sup>90,68</sup> .
	Tracto urinario	Pielonefritis: Fiebre, dolor en el flanco y mal estado general. Cistitis: Urgencia urinaria, disuria, poliaquiuria y rasgos de sangre en la orina. Uretritis: Sensación de quemadura y purito <sup>54</sup> .

\*En *C. dubliniensis* no han sido descritos casos de infecciones oculares ni de esofagitis.

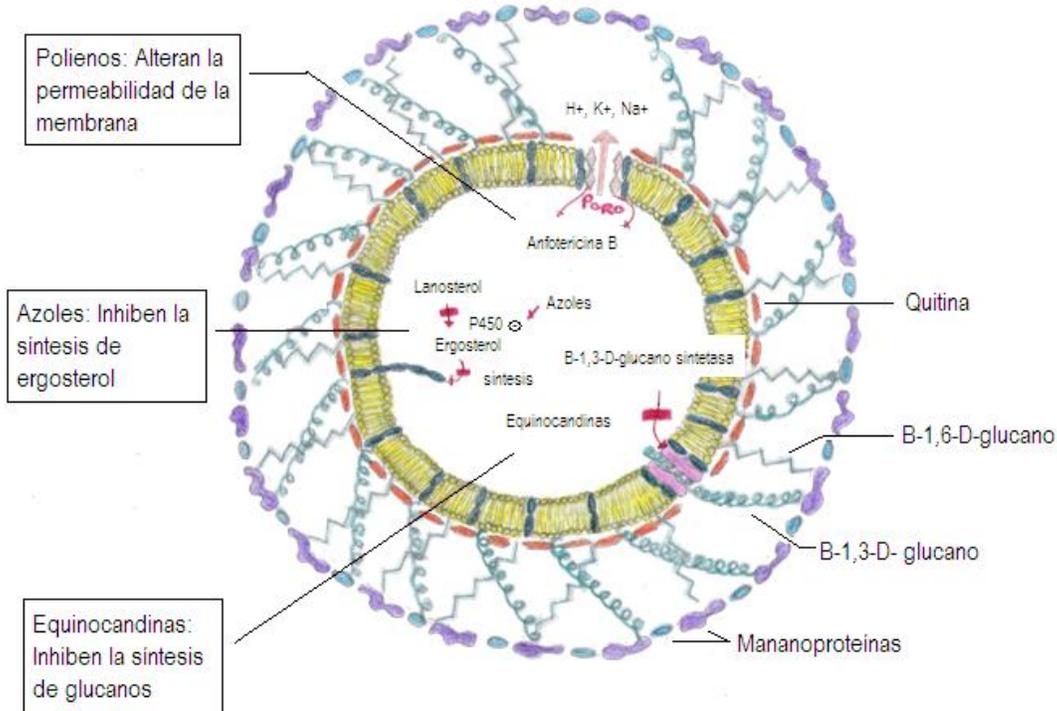
## I. 9 Antifúngicos

Los antifúngicos usados en el tratamiento de las diversas formas clínicas de las candidosis se dividen en tres grupos: 1) Polienos (anfotericina B (AMB), nistatina), 2) Azoles, imidazoles (ketoconazol (KTZ)); triazoles de primera generación (fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ)); triazoles de segunda generación (voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ)), 3) Equinocandinas (caspofungina (CSF) y anidulafungina (ANF)) (Figura 5) <sup>27</sup>. Aún se siguen sintetizando nuevas moléculas principalmente del grupo de los azoles.

Anfotericina B, es un macrólido poliénico natural, sintetizado a partir de *Streptomyces nodosus* <sup>43</sup>. Tiene un efecto fungistático o fungicida, lo que depende del microorganismo y la concentración del inóculo. Este fármaco muestra gran afinidad por los esteroides de la membrana celular; principalmente es mayor por el ergosterol, lo que explica su selectiva especificidad, al fijarse a la membrana fúngica, para formar un poro transmembranal por su extremidad hidrofílica hacia la luz del poro y su extremo lipofílico hacia la membrana. Se altera la permeabilidad con salida de cationes citoplasmáticos como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, distensión y finalmente muerte celular <sup>117</sup>.

A partir de la década de 1980, los azoles cumplieron una función importante en el tratamiento de las micosis superficiales y sistémicas. Estos fármacos son compuestos sintéticos, cuya presentación es para aplicación tópica o sistémica <sup>43</sup>. El mecanismo de acción de estos compuestos es formar un complejo entre el azol y el citocromo P450 y como consecuencia se inhibe la oxidación inicial del lanosterol, un paso esencial para que actúe la enzima  $\alpha$ 1,4-desmetilasa que cataliza la 14C-desmetilación del lanosterol, que es el precursor del ergosterol. La disminución resultante de la cantidad de ergosterol altera la permeabilidad de la membrana e interfiere en la acción de las enzimas asociadas a la membrana. El efecto global es una inhibición de la replicación, ya que repercute en la transformación de la fase de levadura a hifa en *C. albicans* <sup>117</sup>.

Las equinocandinas son lipopéptidos sintéticos derivados de diversos hongos (ANF: *Aspergillus nidulans*; CSF: *Glarea lozoyensis*) <sup>24</sup>; las moléculas son hexapéptidos cíclicos anfifílicos con una cadena lateral aminoacilipídica. La caspofungina tiene un ácido graso como cadena lateral y anidulafungina una cadena alcoxitrifénilo. Estos fármacos son fungicidas contra la mayoría de los aislados de *Candida*. El mecanismo de acción de estas moléculas es sobre la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano de la pared fúngica. Por lo tanto, la pérdida de glucano de la pared fúngica lleva a un cambio osmótico, distensión y lisis de la célula fúngica <sup>117</sup>.



**Figura 5.** Mecanismo de acción de los antifúngicos usados para el tratamiento de las micosis.

### I.10 Resistencia antifúngica

En los últimos años la resistencia a los antifúngicos, principalmente a los compuestos azólicos ha cobrado importancia mundial (Cuadro 6). Varios son los mecanismos para explicar su actividad: menor acumulación de compuestos azólicos, debido a la modificación o hiperproducción de la diana o sitio blanco; aumento de la actividad del citocromo P450, lo que llevaría a una mayor concentración del antifúngico <sup>117</sup>.

La resistencia de los hongos a la anfotericina B, aunque poco frecuente, se acompaña de disminución de contenido de ergosterol de la membrana <sup>74</sup>.

Aún no se ha descrito resistencia cruzada en equinocandinas con polienos ni con azoles y aparentemente no se produce por la diferencia en el mecanismo de acción <sup>27</sup>.

**Cuadro 6.** Resistencia de *C. albicans* y *C. dubliniensis* a los diferentes antifúngicos

Autor	Año	Antifúngico	% Resistencia	
			<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Quindós y cols <sup>85</sup>	2000	KTZ	NC	11
		FLZ	NC	11
		ITZ	NC	8.3
Alvarado y cols <sup>4</sup>	2002	FLZ	11	NC
		ITZ	11	NC
Rubio y cols <sup>93</sup>	2003	VRZ	32	S
		PSZ	32	S
Manzano y cols <sup>63</sup>	2008	KTZ	18	33
		FLZ	S	33
		ITZ	12.5	33
		VRZ	S	33
Manzano y cols <sup>61</sup>	2008	ITZ	12.5	50
Loza <sup>58</sup>	2009	KTZ	11	NC
		FLZ	4	NC
		ITZ	4	NC
Chunchanur <sup>21</sup>	2009	KTZ	NC	18
		FLZ	NC	22
Ricciardi <sup>88</sup>	2009	FLZ	21.5	S
		ITZ	43	25
		VRZ	14	S
		AMB	7	25
Badiee <sup>10</sup>	2010	FLZ	10.25	6.45
		ITZ	8.5	9.67
Manzano y cols <sup>62</sup>	2011	KTZ	8	S
		FLZ	2.7	S
		ITZ	8	S
Zomorodian <sup>127</sup>	2011	KTZ	3.2	S

NC: No considerado; S: sensible

Un ejemplo de ello es el estudio *in vitro* realizado en 2003, donde se reportó que el VRZ y el PSZ fueron los antifúngicos más efectivos, en comparación a FLZ, incluso en las cepas resistentes a FLZ, como es el caso de *C. albicans*; en este mismo estudio *C. dubliniensis* fue la especie más sensible a VRZ, PSZ y FLZ <sup>93</sup>. Posteriormente, otro estudio revela la resistencia que presentaron las cepas de *C. albicans* hacia KTZ e ITZ, mientras que las de *C. dubliniensis* mostraron resistencia a cuatro de los azoles estudiados (KTZ, ITZ, VRZ y FLZ)

<sup>61</sup>.

### **I.11. Pruebas de sensibilidad antifúngica**

En los años 90's el número de antifúngicos descritos era limitado, la resistencia observada era poco común y no había estudios sobre la correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Estos factores dieron un giro con el aumento en la incidencia de enfermedades micóticas, especialmente las invasivas y diseminadas; como consecuencia aumentó el uso de antifúngicos existentes, con un incremento en los fracasos al tratamiento empleado; por lo que los investigadores se preguntaron ¿Por qué los pacientes no responden al tratamiento?. Una de las explicaciones fue la resistencia "innata o adquirida" de los hongos a los antifúngicos existentes. Este cambio llevó a la síntesis de nuevas moléculas y como consecuencia fue necesario conocer el comportamiento de los hongos ante los diversos antifúngicos. Por lo tanto, se tuvieron que estandarizar pruebas de sensibilidad antifúngica <sup>100</sup>.

Para el estudio de sensibilidad antifúngica, se han estandarizado varios métodos, como los de dilución en caldo (macrodilución y microdilución) que se explican en los diversos documentos del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) antes llamado "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS). Actualmente el documento M27-A3 es el más reciente descrito el CLSI para seguir los lineamiento de la técnica antifúngica de microdilución en caldo para levaduras <sup>22</sup>.

Desde el año 1997, se dispone de la técnica estándar de referencia M27-A (microdilución en caldo) para estudiar la sensibilidad *in vitro* de *Candida spp* a los antifúngicos, ya que se conocían los puntos de corte a FLZ, ITZ y 5-flucitosina, para interpretar esta prueba <sup>75</sup>.

Los métodos comercializados son la prueba de "Sensititre Yeast One®", se basa en el fundamento de microdilución en caldo adicionado con un indicador colorimétrico, el cual facilita la lectura. Otros métodos en medios sólidos son los de difusión en agar, los cuales utilizan discos o cintas impregnados con los antifúngicos. Etest® es un método cuantitativo para determinar concentración mínima inhibitoria (CMI). Una comparación entre los resultados obtenidos por Etest® y el método estándar del CLSI mostraron

diferencias en la dosis del antifúngico para determinadas especies de *Candida*, que variaba de acuerdo con la prueba, entre el 71% y 84% <sup>100</sup>.

## II. Planteamiento del problema

Mundialmente, *C. albicans* es la principal especie causante de algunas de las formas clínicas de candidosis, a pesar del cambio que se ha observado en las dos últimas décadas, donde esta especie ha sido reemplazada en frecuencia por las especies de *Candida* no *albicans*. Otro de los hallazgos es la diferenciación de los aislados identificados inicialmente como *C. albicans*, que pasaron a formar parte de *C. dubliniensis*, ya que se demostró su similitud morfológica con esta especie, hecho reportado desde hace más de 15 años. *Candida dubliniensis* fue relacionada con candidosis bucal en pacientes portadores de VIH y SIDA y que no respondían al tratamiento con FLZ. En la actualidad se considera que la frecuencia de *C. dubliniensis* es del 1-32% como causante de infección de diversas formas clínicas y relacionada principalmente con VIH/SIDA. Además de que se ha demostrado que es menos sensible a los antifúngicos y con una resistencia adquirida, principalmente a FLZ.

A partir de estos hallazgos se realizaron estudios fenotípicos con la introducción de diversas pruebas aparentemente útiles para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, la mayoría de los resultados obtenidos con estas pruebas fueron variables y no concluyentes.

En la mayoría de los estudios mexicanos no se identifica a las especies de *Candida*, a pesar de que son causa frecuente de morbilidad en pacientes hospitalizados y por lo tanto se desconoce la frecuencia de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina UNAM, se han establecido criterios morfológicos de identificación y diferenciación de estas dos especies.

Mundialmente se ha reportado que la resistencia antifúngica de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fue del 13% y 22.7%, respectivamente, mientras que en México existe solo un trabajo previo donde se ha descrito que los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan una resistencia similar a KTZ, ITZ y PSZ del 29%, FLZ del 6 % y a VRZ del 1.5% <sup>66</sup>.

Por todo lo anterior resalta la importancia de diferenciar a los aislados de *C. dubliniensis* de los de *C. albicans* mediante pruebas fenotípicas establecidas, principalmente en pacientes hospitalizados que presentan alto riesgo de desarrollar candidosis y también investigar el patrón de sensibilidad a los diversos antifúngicos, con la finalidad de que los médicos clínicos administren el tratamiento más adecuado para cada paciente con esta patología.

### **III. Objetivos**

#### **III.1 Objetivos Generales:**

Identificar por pruebas fenotípicas diferenciales a *C. albicans*/*C. dubliniensis* en aislados levaduriformes obtenidos de pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México.

Conocer el patrón de sensibilidad antifúngica en los aislados de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*.

#### **III.2 Objetivos particulares:**

Determinar la frecuencia de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Identificar las asociaciones de especies de *Candida* no *albicans* con *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Correlacionar los aislados de *C. albicans* y de *C. dubliniensis* con las formas clínicas de candidosis.

Conocer la relación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* con los factores predisponentes asociados.

Comparar la resistencia de los aislados de *C. albicans* de los de *C. dubliniensis* a los siguientes antifúngicos: KTZ, ITZ, FLZ, VRZ, PZC, AMB, CSF y ANF.

## **IV. Material y métodos**

### **IV. 1 Procedencia de los aislados**

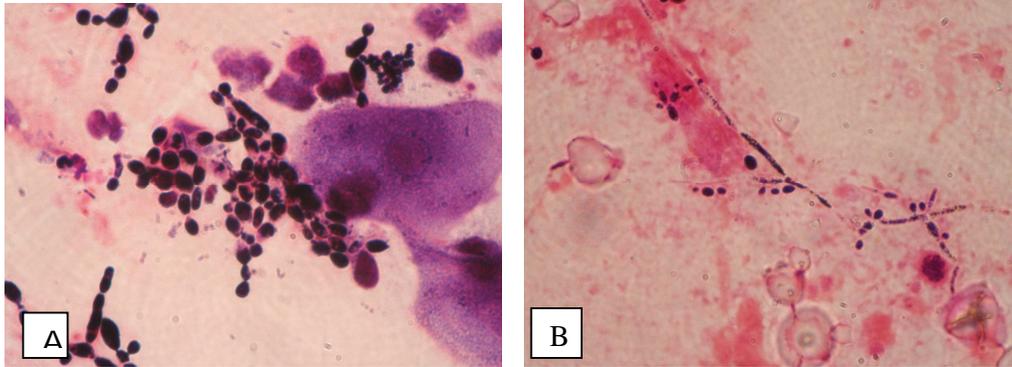
Se realizó un estudio transversal, prospectivo y observacional de la identificación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* a partir de aislados levaduriformes provenientes de 3 hospitales de la Ciudad de México: Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro" Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Hospital General "Dr. Manuel Gea González" Secretaría de Salud y Asistencia (SSA) y Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). La recolección de los especímenes se llevó a cabo en un periodo de 6 meses, del 1 de agosto del 2010 al 1 de febrero del 2011. Se utilizó una cepa tipo de *C. albicans* (ATCC 90028).

### **IV. 2 Pacientes**

Los datos obtenidos de cada uno de los pacientes fueron registrados en una base de datos, que incluyeron: género, edad, factor predisponente asociado, forma clínica de la candidosis, tiempo de evolución de la infección y tratamiento antifúngico previo.

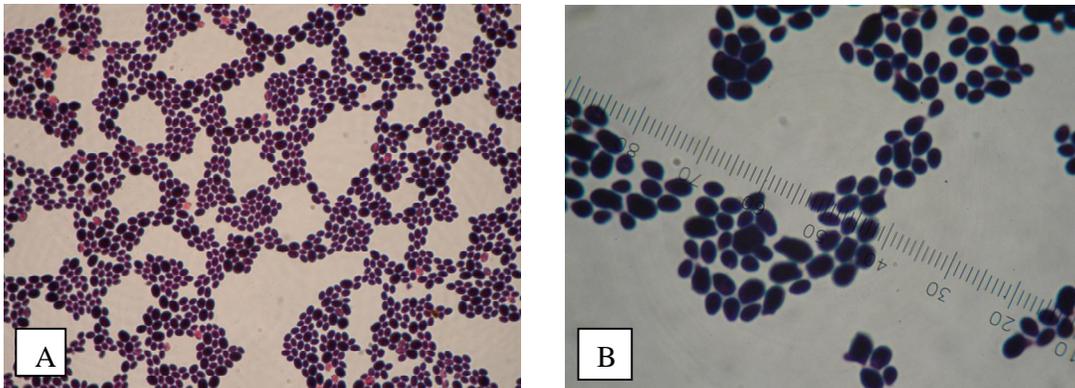
### **IV. 3 Identificación de las levaduras**

Las muestras obtenidas fueron procesadas de la siguiente manera: 1) especímenes biológicos como las escamas de uñas o de piel, a las cuales se les realizó un examen microscópico directo con KOH al 15%; mientras que a los exudados de boca, vagina y lavado de líquido bronquioalveolar (LLBA), frotis teñido con Gram. Mediante estas técnicas se valoró la estructura parásita de las levaduras (cúmulos de blastoconidios, pseudohifas e hifas, solas o en conjunto) (Figura 6). Los especímenes se inocularon en agar dextrosa Sabouraud (ADS), agar dextrosa Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (ADS-CC) y CHROMagar Candida® (CH).



**Figura 6.** Frotis del LLBA teñido con Gram. A) Levaduras. B) Pseudohifas.  
 2) Cultivos obtenidos en agar sangre, agar chocolate, agar biggy, agar dextrosa Sabouraud, medios cromógenos (CHROMagar Candida® y CAN2®).

Todos los aislados fueron purificados, inicialmente se realizó un frotis con tinción de Gram, la morfología levaduriforme y sin asociación con bacterias (Figura 7). Se obtuvo un cultivo monocelular en CH a partir del crecimiento de los aislados de 24 h en ADS, se realizó una suspensión a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ mL y se inocularon las placas de CH con 2  $\mu$ L que se distribuyeron por estría cerrada, se incubaron a 37 °C durante 48 h.

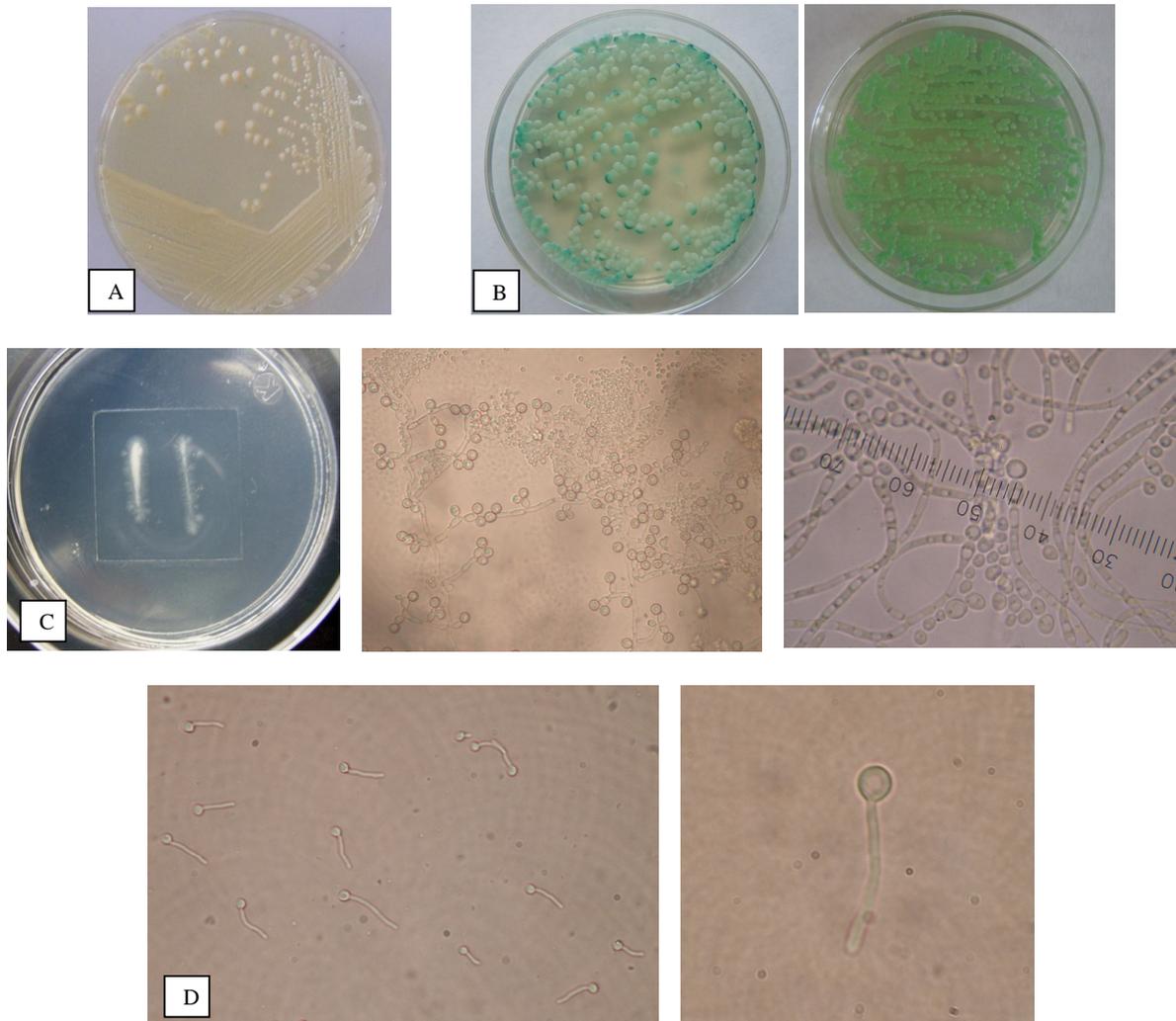


**Figura 7.** Levaduras ovales, tinción Gram. A) 40 x B) 100x

#### IV. 4 Pruebas fenotípicas no diferenciales

Todas las colonias de color verde obtenidas en CH se sembraron en ADS y ADS-CC por estría de aislamiento a 28 °C, durante 24 h. Del crecimiento colonial en ADS se inocularon en agar harina de maíz adicionado con Tween 80 al 1% (HM) por la técnica de Dalmau, que consistió en tomar una pequeña porción de la colonia y se inoculó dibujando dos líneas paralelas de 1cm sobre la superficie

del medio, se colocó un cubre objetos estéril, incubar a 28 °C durante 72 h; posteriormente se observó directamente al microscopio la producción de clamidoconidios. Formación de tubo germinativo en suero, esta técnica se realizó inoculando una pequeña porción de la colonia, homogenizando en el suero y se incubó a 37 °C durante dos horas (Figura 8).



**Figura 8.** Pruebas fenotípicas no diferenciales. A) Colonias levaduriformes en ADS-CC. B) Cultivo monocelular de las colonias de color verde claro y oscuro en CHROMagar *Candida*®. C) Placa de HM inoculada por técnica de Dalmau, por microscopia de luz, clamidoconidios a 40x y 100x. D) Tubo germinativo en suero a 40x y 100x.

#### IV. 5 Pruebas fenotípicas diferenciales

Para la diferenciación de las dos especies se realizaron tres pruebas morfológicas en tres medios de cultivo: agar Staib (AS), agar tabaco (AT) y agar caseína

modificado (ACM). A partir del crecimiento de 24 h en ADS a 28 °C, cada uno de los aislados se inoculó por la técnica de puntilleo en los tres medios, se incubaron a 30 °C durante 72 h. Se observaron las características macromorfológicas, superficie, forma, color y presencia de halo velloso alrededor de las colonias, posteriormente se hizo un examen directo con azul de algodón para observar clamidoconidios, éstos se valoraron por cruces de acuerdo al porcentaje de clamidoconidios por el campo visual: - = 0% ausente; + = 25%; ++ = 50%; +++ = 75%; ++++ = 100%.

También se efectuó la prueba de termotolerancia a 45° C en agar papa dextrosa (APD), a partir del crecimiento colonial de 24 h en ADS a 28 °C de cada uno de los aislados en estudio, se realizó una suspensión en solución salina al 0.85% a una concentración de 1X10<sup>6</sup> células/mL, se tomaron 2 µL y se sembraron por estría cerrada sobre la superficie del agar, se incubaron por 48 h. La lectura se valoró por cruces, de acuerdo a la siguiente escala por el número de colonias: 100% (++++); 75% (+++); 50% (++); 25% (+); 0% (-). La interpretación de las cuatro pruebas se resume en el cuadro 7. Las cuatro pruebas se realizaron por triplicado.

**Cuadro 7.** Criterios para la identificación por pruebas diferenciales a *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Pruebas	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Agar tabaco (AT) <sup>44</sup>	- Colonias de superficie lisa y blanquecinas - Ausentes o escasos clamidoconidios únicos	- Colonias de superficie rugosa y color marrón con halo velloso alrededor - Abundantes clamidoconidios en racimo
Agar Staib (AS) <sup>107</sup>	- Colonias sin halo velloso alrededor - Ausentes o escasos clamidoconidios únicos	- Colonias de superficie rugosa con halo velloso alrededor - Abundantes clamidoconidios en racimo
Agar Caseína (AC) <sup>71</sup>	- Ausentes o escasos clamidoconidios únicos	- Abundantes clamidoconidios en racimo
Termotolerancia (por cruces) <sup>108</sup>	-Abundante crecimiento a 45 °C	-Ausente crecimiento a 45°C

#### IV.6 Sensibilidad antifúngica

Para todos los aislados obtenidos se realizó la prueba de sensibilidad antifúngica, por el método de microdilución en caldo siguiendo la descripción del documento M27-A3 del CLSI (CLSI 2008). El medio utilizado fue RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato y rojo de fenol como indicador de pH. El amortiguador utilizado fue ácido (3 [N- morfolino]propanosulfónico) y se ajustó a pH de 7.

#### IV.7 Solución madre de antifúngicos

Para la preparación de esta solución de cada uno de los fármacos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) o agua químicamente pura (MQ), dependiendo de la solubilidad del antifúngico, para obtener una concentración 10 veces mayor de éste.

#### IV.8 Preparación de microplacas

Se hicieron las diluciones descendentes para ser distribuidas en los pozos de las columnas 1 a 10 de la microplaca de 96 pozos, cuya concentración final mayor correspondió a la columna 1 y la concentración menor a la columna 10 (Cuadro 8). Las columnas 11 y 12 correspondieron al control de crecimiento y esterilidad, respectivamente. Los pozos de la columna 11 se llenaron con RPMI y los pozos de la columna 12 con RPMI más DMSO al 1% para los antifúngicos insolubles y con RPMI para los solubles.

**Cuadro 8.** Antifúngicos, solvente e intervalo de concentración final distribuidos en las microplacas.

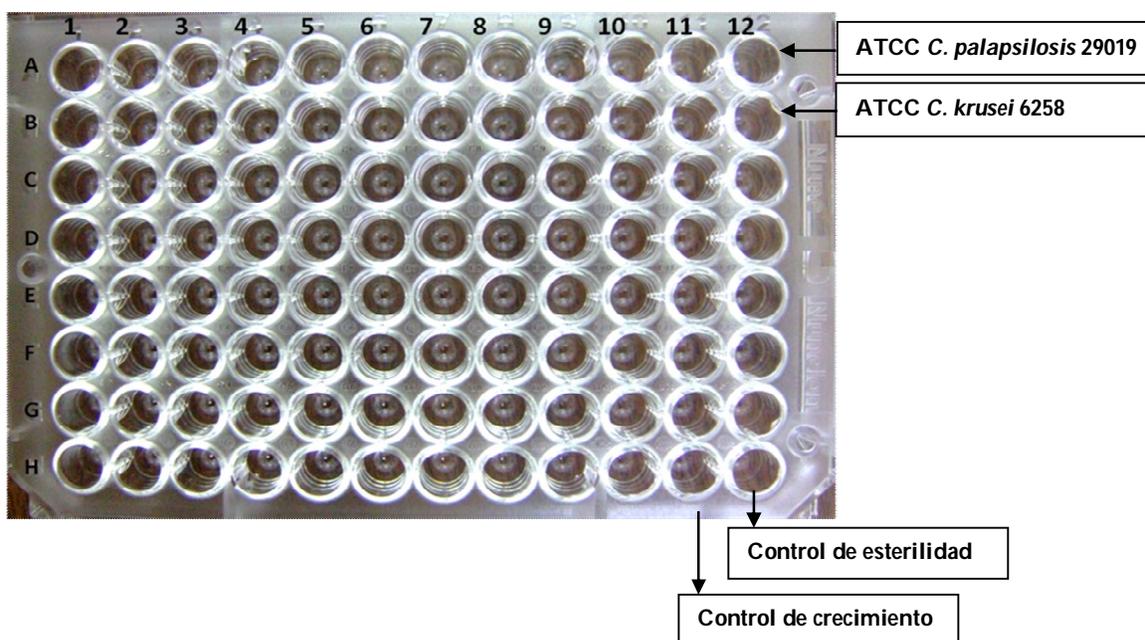
Solubilidad	Antifúngico	Solvente	Concentración final (µg/mL)
Insolubles	Ketoconazol (KTZ)	DMSO	16-0.03
	Itraconazol (ITZ)		16-0.03
	Voriconazol (VRZ)		16-0.03
	Posaconazol (PZC)		16-0.03
	Anfotericina B (AMB)		16-0.03
	Anidulafungina (ANF)		32-0.06
Solubles	Fluconazol (FLZ)	MQ	64-0.125
	Caspofungina (CSF)		16-0.03

#### IV.9 Preparación del inóculo

A partir de un crecimiento de 24 h en ADS a 30 °C, de cada uno de los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*; se realizó una suspensión en 1 mL de solución salina al 0.85% y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### IV.10 Inoculación de las microplacas con cada uno de los antifúngicos

De la suspensión inicial del inóculo, se hicieron diluciones para el llenado de las microplacas, se distribuyeron 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones de los aislados problema en los pozos de las filas de la C a la H con la concentración final del inóculo de  $2.5 \times 10^3$  células/mL. En las filas A y B se inocularon las cepas control de calidad del método (ATCC *C. parapsilosis* 29019 y ATCC *C. krusei* 6258, respectivamente) (Figura 9).



**Figura 9.** Inoculación de microplacas. Las columnas 1-10 corresponden a las diluciones de los antifúngicos; las columnas 11 y 12 a controles de crecimiento y esterilidad; las filas A y B son controles de calidad del método y las filas de la C a la H son los aislados problema.

Las microplacas se incubaron a 35° C durante 48h. La lectura fue visual mediante un espejo invertido para valorar la concentración mínima inhibitoria (CMI), cuyo significado es la menor concentración del antifúngico, a la cual se

inhibe el crecimiento (80 o 100%) de la levadura, comparado con la columna del control de crecimiento. Los puntos de corte para la interpretación de los resultados se muestran en el cuadro 9.

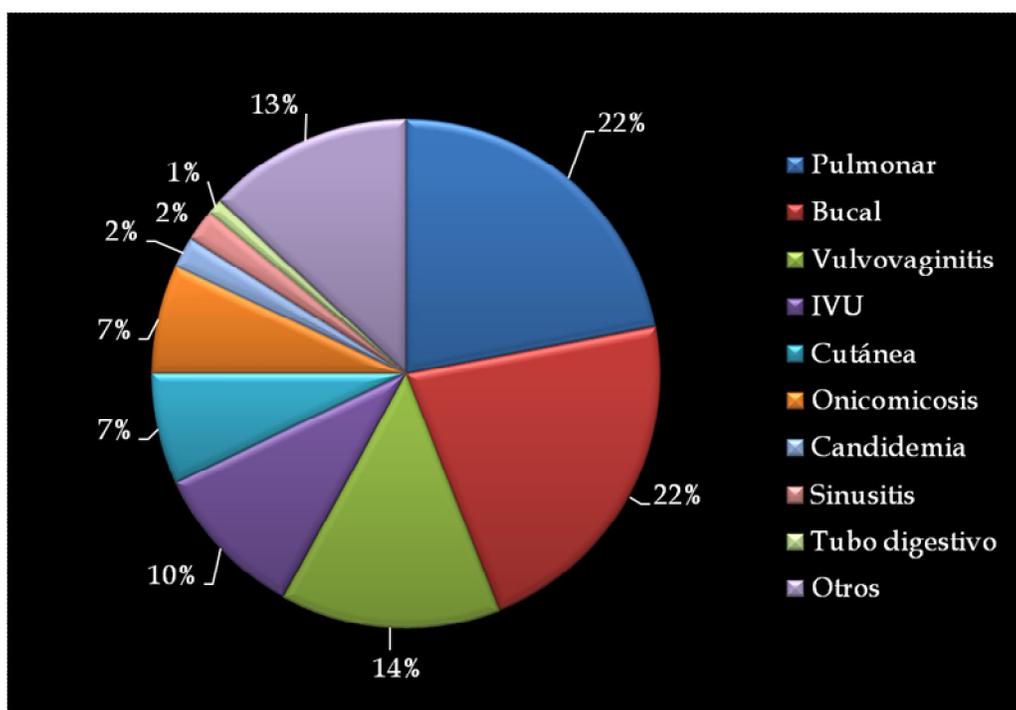
**Cuadro 9.** Puntos de corte establecidos por el CLSI de sensible, sensible dosis dependiente y resistente para levaduras del género *Candida*.

Antifúngico	Sensible	Sensible dosis dependiente	Resistente
Ketoconazol	$\leq 1$	-	$> 1$
Fluconazol	$\leq 8$	16-32	64
Itraconazol	$\leq 0.125$	0.25-0.5	$\geq 1$
Voriconazol	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Posaconazol	$< 1$	-	$\geq 1$
Anfotericina B	$\leq 1$	-	$\geq 2$
Caspofungina	$< 2$	-	2
Anidulafungina	$< 2$	-	2

## V. Resultados

De un total de 157 aislados obtenidos de 135 pacientes atendidos en 3 hospitales de la Ciudad de México; el 76% correspondieron al género femenino y el 24% al género masculino. El intervalo de edad fue de 10 a 84 años, con un promedio de 47 años.

En la figura 10 se muestra las formas clínicas de candidosis de los 135 pacientes estudiados, las más frecuentes fueron: candidosis pulmonar (22.2%), bucal (22%) y vulvovaginitis por *Candida* (14%).



IVU: Infección de vías urinarias por *Candida*.

**Figura 10.** Porcentaje de las formas clínicas de candidosis observada en 135 pacientes.

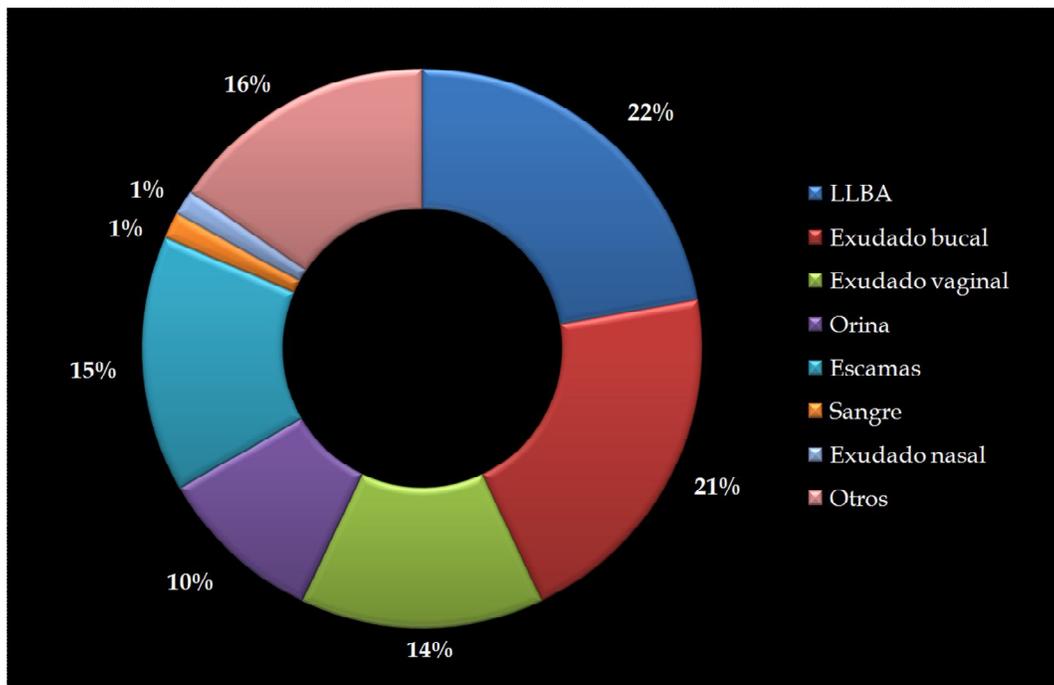
Los factores predisponentes fueron diabetes mellitus tipo 2 (DM2) descompensada, anemia, menopausia, embarazo, sepsis, peritonitis, leucemia, SIDA, trasplante, uso prolongado de antibióticos de amplio espectro e inmunosupresores. El factor asociado relacionado con la forma clínica de candidosis, se muestra en el cuadro 10. El principal factor relacionado con la candidosis pulmonar fue la administración de antibióticos de amplio espectro (47%); en los pacientes que cursaron con candidosis bucal fue DM2 (71%); mientras que en la vulvovaginitis por *Candida* fueron menopausia y embarazo

(58%). Solamente en 7 de los 135 pacientes se observó la asociación de dos o más factores.

**Cuadro 10.** Relación de las principales formas clínicas de candidosis y el factor predisponente.

Forma clínica	Factor predisponente
Pulmonar	Antibióticos de amplio espectro, sepsis, anemia y DM2
Bucal	DM2 y SIDA
Vulvivaginitis	Menopausia y embarazo
IVU	DM2 y peritonitis
Cutánea	Trasplante e inmunosupresores
Tubo digestivo	SIDA
Sinusitis	Leucemia

En la figura 11 se muestra el origen del espécimen biológico, el cual estuvo relacionado con la forma clínica de candidosis, donde los principales fueron lavado de líquido bronquioalveolar (LLBA) (22%); seguido de exudado de boca (21%) y exudado vaginal (14%).



**Figura 11.** Especímenes biológicos procesados de 135 pacientes. \* LLBA= Líquido de lavado bronquioalveolar.

**Fenotipificación:** De los 157 aislados levaduriformes obtenidos de 135 pacientes, 66 (42%) correspondieron a especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*; mientras que 91 (58 %) a *C. albicans*/*C. dubliniensis*. Para fines de este estudio solo se analizaron los resultados relacionados con *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En el cuadro 11 se muestra la procedencia de 91 muestras procesadas que correspondieron a estas dos especies.

**Cuadro 11.** Aislados de *C. albicans* /*C. dubliniensis* obtenidos de pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México.

Hospital	Número de aislados
H. G. Dr. Darío Fernández	27
H.G. Dr. Manuel Gea González	28
H. Especialidades CMN Siglo XXI	36
Total	91

Los 91 aislados presentaron crecimiento en ADS-CC; colonias de diversas tonalidades de verde en CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>; la producción de clamidoconidios en HM y la formación de tubo germinativo en suero.

La caracterización fenotípica por pruebas diferenciales de los 91 aislados *C. albicans* y *C. dubliniensis* se muestra en el cuadro 12. Por la variabilidad fenotípica que se presentó en los diversos aislados se describieron cuatro criterios fundamentales: 1) Morfología macroscópicas. En ACM, AS y AT el 100%, 99% y 95% de los aislados presentaron superficie lisa; mientras que en AT en el 5% fue evidente la superficie rugosa. De los tres medios esta característica diferencial entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se observó principalmente en AT, ya que el 95% de los asilados mostraron superficie lisa y correspondieron a *C. albicans*, mientras que el 5% con superficie rugosa fueron identificados como *C. dubliniensis*. En las figuras 12 y 13 se hacen evidentes los dos morfotipos observados en los aislados identificados como *C. dubliniensis*.

2) Color de las colonias (blanquecino y marrón). Las colonias de color blanquecino predominaron en ACM y AS en el 100% de los aislados; mientras

que en AT en el 67%. El color marrón intenso y opaco en AT fue característico en los aislados de *C. dubliniensis*, ya que se presentó en el 100% (Figuras 12 y 13).

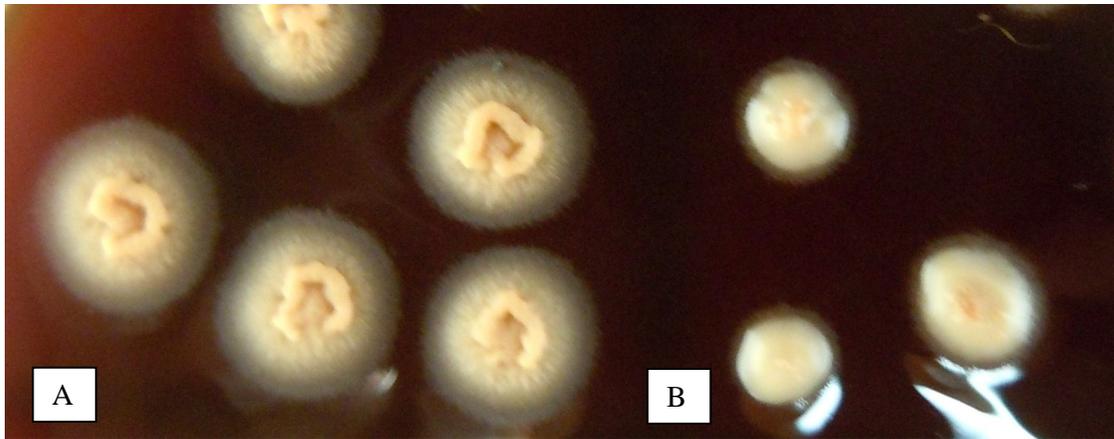
3) Otro de los criterios morfológicos fue el halo filamentosos, este se dividió en largo, corto o ausente. En los tres medios probados, el halo filamentosos largo se presentó en el 10 al 30% de los aislados; mientras que el corto solamente en AT y en ACM en el 15 al 43% y en AS en ninguno. En los tres medios la ausencia de halo fue evidente (44 al 75%). Los aislados de *C. dubliniensis* mostraron halo filamentosos largo en AS y AT, en comparación a los aislados de *C. albicans* que en la mayoría fue ausente (Figura 14).

4) Morfología microscópica la producción de clamidoconidios en los tres medios se dividió en abundantes en racimo, escasos únicos y ausentes. El 100% de los aislados de *C. dubliniensis* presentó abundantes en racimo en los tres medios, en cambio en *C. albicans* en el 70% de los casos fueron escasos únicos y en el 24% ausentes (Figuras 15 y 16).

En la prueba de termotolerancia, todos los aislados de *C. dubliniensis* no crecieron a 45 °C, en cambio los de *C. albicans* crecieron a 45 °C de acuerdo a la escala establecida: (++++) el 22.5 % de los aislados; (++++) el 29.5%; (++) el 34% y (+) el 14% (Figura 17).

**Cuadro 12.** Criterios morfológicos observados en las colonias de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en tres medios diferenciales (AT, AS y ACM).

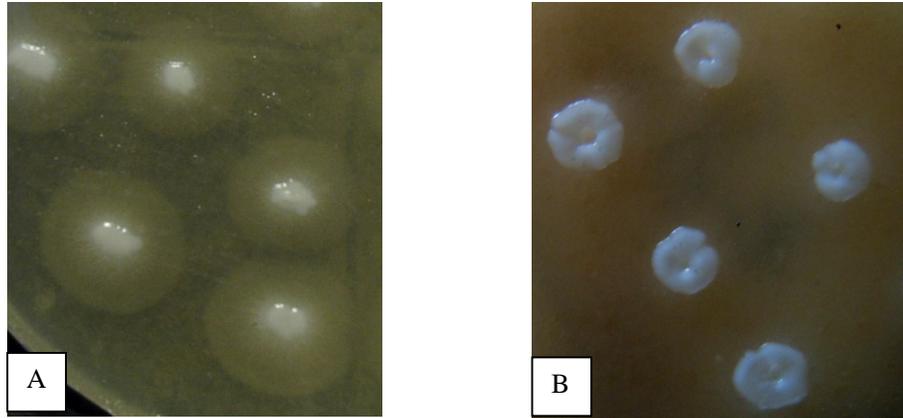
Características morfológicas		AT	AS	ACM
Color	Blanquecino	61 (67 %)	91 (100 %)	91 (100 %)
	Marrón	30 (33 %)	0	0
Superficie	Lisa	86 (95 %)	90 (99 %)	91 (100 %)
	Rugosa	5 (5 %)	1 (1 %)	0
Halo filamentosos	Largo	12 (13 %)	27 (30 %)	9 (10 %)
	Corto	39 (43 %)	0	14 (15 %)
	Ausente	40 (44 %)	64 (70 %)	68 (75 %)
Clamidoconidios	Abundantes Racimo	5 (5 %)	5 (6 %)	5 (6 %)
	Escasos Únicos	66 (73 %)	64 (70 %)	64 (70 %)
	Ausentes	20 (22 %)	22 (24 %)	22 (24 %)



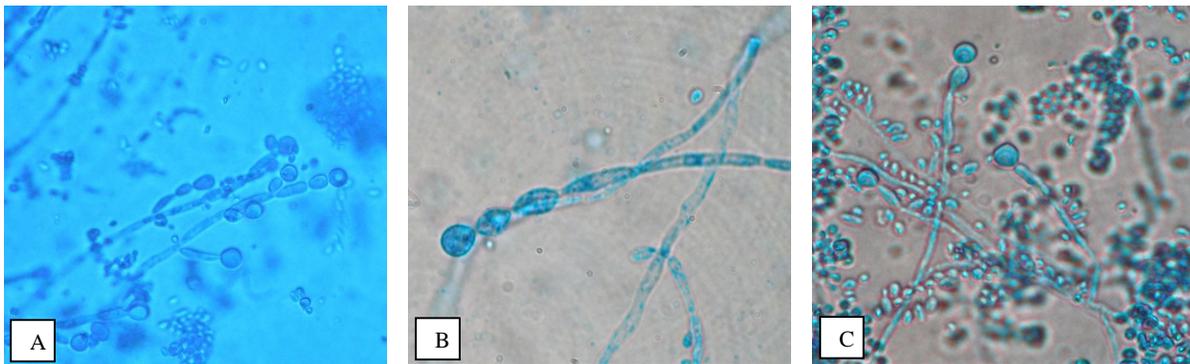
**Figura 12.** Colonias de *C. dubliniensis* y *C. albicans* en AT. A) *C. dubliniensis*, colonias de color marrón intenso opaco, superficie rugosa de tipo crateriforme, en el margen con halo velloso largo. B) *C. albicans*, colonias de color beige brillantes, superficie lisa, en el margen halo velloso corto.



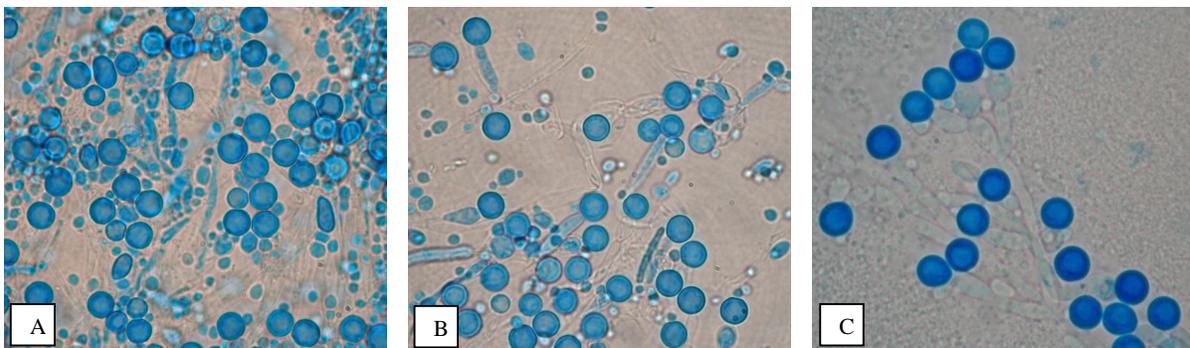
**Figura 13.** Colonias de *C. dubliniensis* y *C. albicans* en AT. A) *C. dubliniensis*, colonias de color marrón intenso opaco, superficie rugosa de tipo cerebriforme, en el margen halo velloso corto. B) *C. albicans*, colonias de color marrón claro brillantes, superficie lisa, en el margen halo velloso corto.



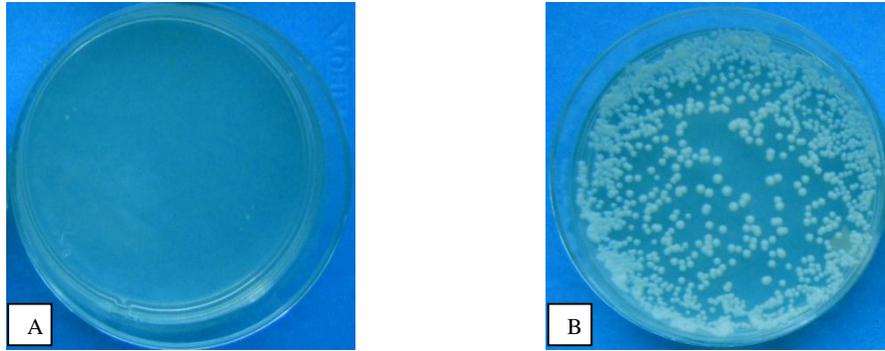
**Figura 14.** Colonias de *C. dubliniensis* y *C. albicans* en AS. A) *C. dubliniensis*, colonias de color blanco brillante, superficie lisa, con halo vellosos largo en el margen. B) *C. albicans*, colonias color blanco brillante, ausencia de halo vellosos en el margen.



**Figura 15.** Clamidoconidios únicos sobre una hifa larga de *C. albicans*. A) agar tabaco (40x), B) agar Staib (100x) y C) agar caseína modificado (40x)



**Figura 16.** Clamidoconidios abundantes en racimo sobre una hifa corta de *C. dubliniensis*. A) agar tabaco (100x), B) agar Staib (100x) y C) agar caseína modificado (100x).

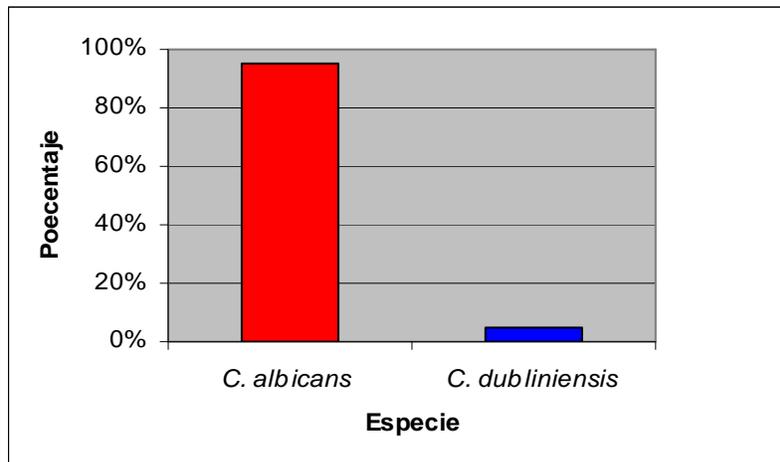


**Figura 17.** Placas de APD incubadas a 45° C. A) *Candida dubliniensis*, sin crecimiento a 45 °C. B) *C. albicans* con crecimiento a 45 °C (+++).

Tomando en cuenta los criterios para diferenciar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* en los 91 aislados obtenidos de diferentes muestras procesadas, los resultados fueron los siguientes, 86 aislados se identificaron como *C. albicans* y 5 como *C. dubliniensis* (Cuadro 13). En la figura 18 se observa la diferencia porcentual de estas dos especies.

**Cuadro 13.** Aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis* obtenidos de los pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México

Hospital	Número de aislados	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
H. G. Dr. Darío Fernández	27	25	2
H.G. Dr. Manuel Gea González	28	25	3
H. Especialidades CMN Siglo XXI	36	36	0
Total	91	86	5

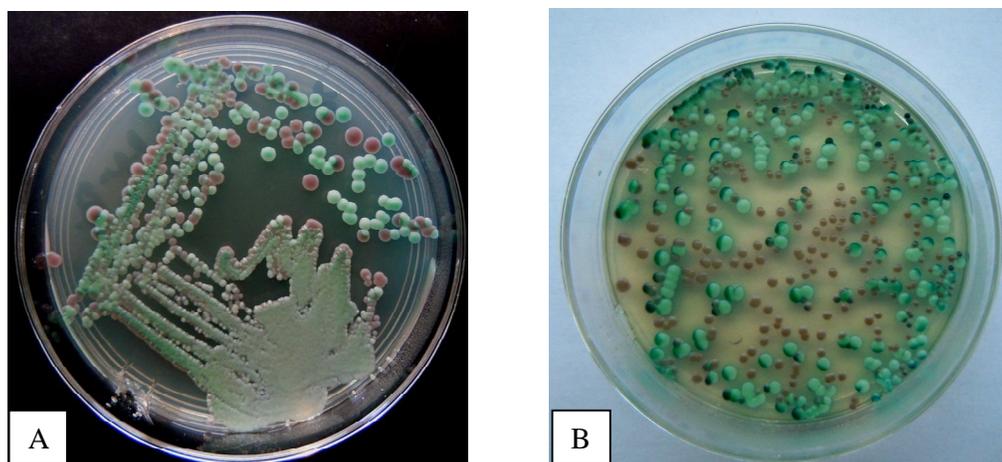


**Figura 18.** Porcentaje de aislados obtenidos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

En 9 (9.8%) de los 91 aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis* se observó una asociación con otras especies de *Candida* no *albicans*. En 7 de los 9 aislados *C. albicans* con *C. glabrata*, de los cuales cuatro fueron obtenidos de mujeres embarazadas que cursaron con candidosis vaginal; una de candidosis pulmonar y una candidemia, donde los factores predisponentes fueron múltiples; finalmente la restante correspondió a un aislado de un paciente con candidosis bucal y SIDA (Cuadro 14). En la figura 19 se muestra la asociación de *C. albicans* con *C. glabrata* en dos de los aislamientos (10-658A2 y 20308). Solo uno de los aislados de *C. dubliniensis* (Ramírez D) se asoció con *C. glabrata* obtenidos de un paciente femenino con candidosis pulmonar y múltiples factores predisponentes. Cabe mencionar que uno de los casos incluidos en este estudio correspondió a un paciente femenino de 68 años que cursó con sepsis posterior a una gastrostomía, estado vegetativo, intubación orotraqueal, anemia, neumonía nosocomial y administración de antibióticos de amplio espectro presentó una candidosis diseminada que afectaba tres aéreas anatómicas: pulmón, tejido subcutáneo y herida quirúrgica, de las dos primeras se aisló la misma especie de *Candida* (*C. albicans*) y de la tercera una especie de *Candida* no *albicans* (*C. krusei*).

**Cuadro 14.** Asociación entre los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis* con otras especies de *Candida* no *albicans*, forma clínica y factor predisponente.

Forma clínica	Factor predisponente	Número de casos	Especies
Vaginal	Embarazo	4	<i>C. albicans</i> - <i>C. glabrata</i>
Pulmonar	Múltiples	1	
Bucal	SIDA	1	
Candidemia	Múltiples	1	
Pulmonar	Múltiples	1	<i>C. albicans</i> - <i>C. tropicalis</i>
Pulmonar	Múltiples	1	<i>C. dubliniensis</i> - <i>C. glabrata</i>



**Figura 19.** A) y B) asociación de *C. albicans* y *C. glabrata* en CHROMagar *Candida*®

**Sensibilidad antifúngica,** los resultados de la CMI de los 91 aislados estudiados se presentan en el cuadro 15.

**Cuadro 15.** Concentración mínima inhibitoria de aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Muestra	Especie	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PZC	AMB	CSF	ANF
LMN30-10	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
27-102	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
27-115	<i>C. albicans</i>	8	64	0.03	0.03	4	0.5	0.125	0.06
30-71	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
30-77	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
391	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.06	0.03	0.125	0.03	0.06
CED-1	<i>C. albicans</i>	0.03	32	0.03	4	0.06	0.25	0.06	0.06
PLIE-1	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
PLIE-2	<i>C. albicans</i>	0.03	8	1	0.03	1	0.5	0.125	0.06
ROS-2	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
10536	<i>C. albicans</i>	0.03	0.25	1	0.03	1	0.5	0.06	0.06
MARG-I	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
13495.4	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06	0.06
20325	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
2068	<i>C. albicans</i>	0.06	64	2	4	1	0.25	0.06	0.06
CED-2	<i>C. albicans</i>	8	0.125	4	0.25	0.03	0.25	0.125	0.06
10-557	<i>C. albicans</i>	16	64	4	16	4	0.5	0.06	0.06
10-542 1	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
542..1 2	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	0.03	0.03	0.5	0.125	0.06
542..2 3	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	0.03	0.03	0.25	0.06	0.06
30105	<i>C. albicans</i>	0.06	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
30301	<i>C. albicans</i>	0.03	16	1	0.03	1	0.5	0.06	0.06

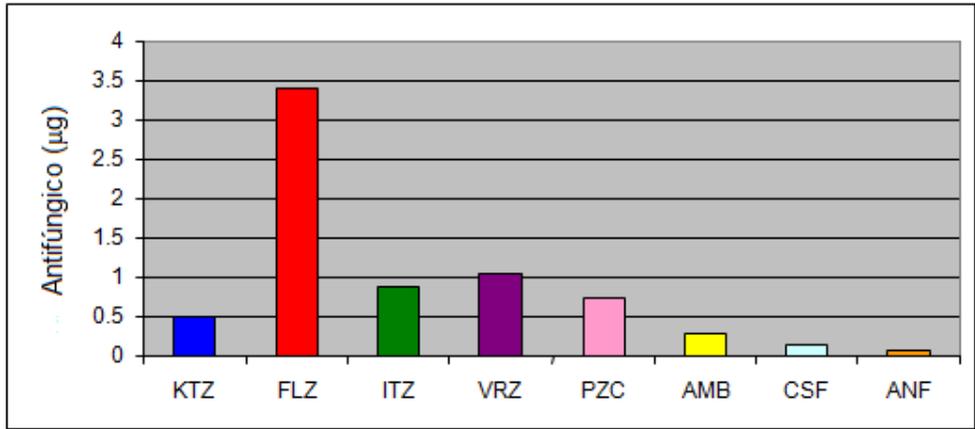
Muestra	Especie	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PZC	AMB	CSF	ANF
547	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.125	0.03	16	0.5	0.06	0.06
MED-GAR	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
20303	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
20308	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
10-574	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	0.03	0.03	0.5	0.125	0.06
CER-M	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.125	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
AUG-N	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
ARU-A	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
DIA-V	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	0.03	0.03	0.25	0.06	0.06
2309173	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
1587	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
6.311	<i>C. albicans</i>	1	0.125	0.06	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
1839	<i>C. albicans</i>	0.06	16	8	8	4	0.5	0.06	0.06
10673	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
10658 A2	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
7.302	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
10671	<i>C. albicans</i>	0.25	2	0.03	8	0.03	0.5	0.03	0.06
1405	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.03	0.06
10-669	<i>C. albicans</i>	0.25	16	0.125	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
10-682 P	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
10-736	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
10-739	<i>C. albicans</i>	1	0.125	1	0.03	2	0.25	0.125	0.06
10-734	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
10-823	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
10-774	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
10-763	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
SAL-JU	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
AVA-JIM	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
GOM-S	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
PACH	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
EST-GAR	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
TELL-GAR	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
MED-Q	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06
HDZ-GAR	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
10-717	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06
10-735	<i>C. albicans</i>	0.03	0.25	0.06	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
10-702	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06
10-706	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03	0.06
10-673	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.03	0.06

Muestra	Especie	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PZC	AMB	CSF	ANF
B002840	<i>C. albicans</i>	1	0.125	4	0.125	1	0.25	0.25	0.06
B001821	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.125	0.06
B4456	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	1	0.03	0.5	0.06	0.06
B2697	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	1	0.25	4	0.06
B1631	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.25	0.125	0.06
B3010	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.06	0.03	0.03	0.125	0.125	0.06
B1322	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	1	1	0.03	0.5	0.125	0.06
B003155	<i>C. albicans</i>	2	0.125	2	0.5	2	1	2	0.06
B001641	<i>C. albicans</i>	0.5	0.125	1	0.5	0.03	0.25	0.25	0.06
B1680	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.125	0.06
B2902	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
B002343	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.125	0.06
B1429	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.125	0.06
B002022	<i>C. albicans</i>	0.25	0.125	1	0.5	2	0.25	0.25	0.06
B002691	<i>C. albicans</i>	1	0.125	1	1	1	0.5	0.25	0.06
B001640	<i>C. albicans</i>	1	0.125	2	2	0.5	0.5	0.125	0.06
B4318	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.125	0.06
B3093	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.25	0.125	0.06
B003894	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.5	0.06
4/11	<i>C. albicans</i>	0.5	16	0.03	16	4	0.5	0.06	0.06
21	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
11-193	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	1	0.125	0.06
09-078	<i>C. albicans</i>	0.03	0.25	0.03	0.06	0.03	0.125	0.03	0.06
130E	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
28/11	<i>C. albicans</i>	0.03	1	0.125	0.125	0.03	0.125	0.125	0.06
185	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	0.125	8	0.03	0.03	0.5	0.06	0.06
566	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	16	8	8	0.03	0.5	0.06	0.06
19499	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.125	0.06	0.06
RAM-D	<i>C. dubliniensis</i>	0.06	1	8	8	4	0.5	0.06	0.06
11	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	0.125	8	8	0.06	0.5	0.06	0.06
<b>Media</b>	<i>C. albicans/ C. dubliniensis</i>	<b>0.56</b>	<b>3.93</b>	<b>0.83</b>	<b>1</b>	<b>0.74</b>	<b>0.27</b>	<b>0.13</b>	<b>0.06</b>

■ Aislados resistentes

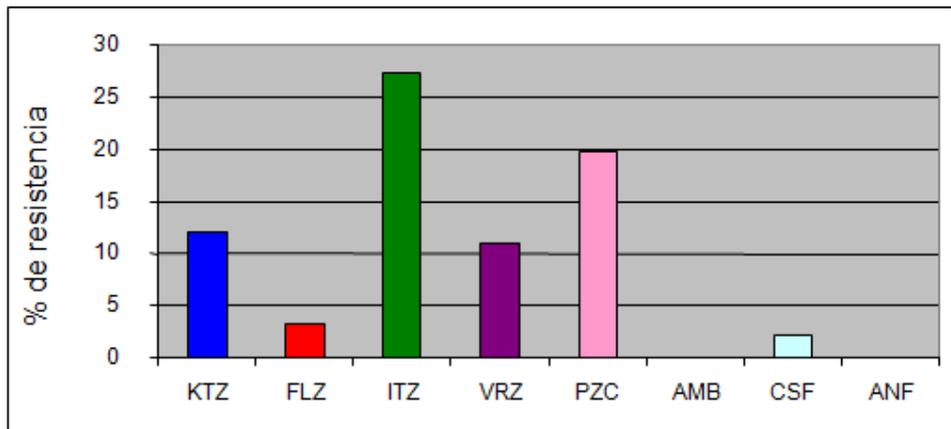
■ Aislados sensible dosis dependiente

La actividad de los diversos antifúngicos estudiados sobre cada uno de los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, se presentan en la figura 20, donde tres de los azoles (ITZ, VRZ y PZC) mostraron menor actividad.



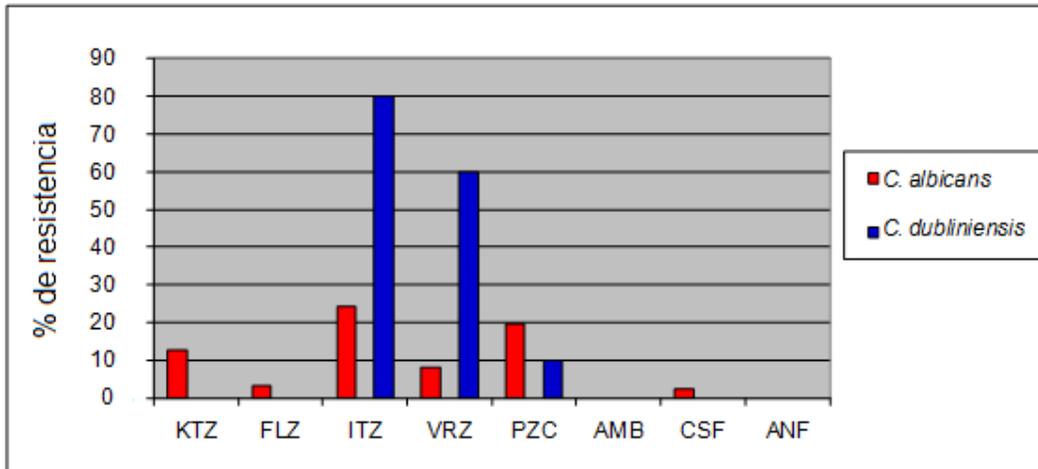
**Figura 20.** Actividad de los 8 antifúngicos sobre los 91 aislados estudiados.

La resistencia observada en los 91 aislados fue principalmente frente a ITZ (27%), seguido de PZC (20%) y KTZ (12%) (Figura 21).



**Figura 21.** Porcentaje de resistencia en los 91 aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Comparando la resistencia observada en los aislados de ambas especies, *C. albicans* mostró resistencia principalmente a ITZ, PZC y KTZ; mientras que *C. dubliniensis* solo frente a ITZ y VRZ (Figura 22). El 3% de los aislados de *C. albicans* presentaron resistencia a FLZ; en cambio el 10% de los aislados de *C. dubliniensis* fue SDD y ninguno resistente.



**Figura 22.** Comparación entre la resistencia de los aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

## VI. Discusión

Actualmente, *C. albicans* es la principal especie causante de la mayoría de las candidosis, sin embargo en las dos últimas décadas esta especie ha disminuido su frecuencia en algunas formas clínicas y ha sido remplazada por las especies de *Candida* no *albicans*<sup>73,10,8</sup>. Así como la descripción de los aislados atípicos que correspondieron a *C. dubliniensis*, los cuales fueron obtenidos de la identificación previa de *C. albicans*, cuyas características fenotípicas eran semejantes<sup>108,57</sup>.

*Candida dubliniensis* es una levadura emergente causante de infecciones superficiales y profundas, inicialmente fue aislada de la cavidad bucal de pacientes VIH/SIDA con candidosis. Diversos estudios han demostrado que es causante de algunas formas clínicas de la infección en pacientes con diferentes factores de oportunidad<sup>35,18,69</sup>; también se ha estudiado la importancia de factores como diferencias geográficas, anatómicas y de raza<sup>57</sup>. Otras de las características particulares observadas en esta especie fue la menor sensibilidad a fluconazol, con posterior resistencia adquirida<sup>108,23</sup>.

En el presente trabajo la forma clínica de candidosis más frecuente fue la pulmonar, similar al estudio realizado por Hernández-Hernández y cols<sup>39</sup>, quienes analizaron diversos especímenes de 108 pacientes, de los cuales 32 presentaron candidosis pulmonar, que es la forma clínica que desarrollan los pacientes hospitalizados<sup>39</sup>. En el estudio realizado por estos investigadores los dos factores predisponentes asociados a esta micosis fueron tuberculosis (20 casos) y SIDA (10 casos), en cambio en el presente trabajo los factores fueron el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro y DM2; el primero asociado al tratamiento de neumonías aparentemente bacterianas, lo que probablemente contribuyó al desarrollo de la infección por *Candida*. También ha sido descrito un incremento en los aislados de esta área anatómica que posiblemente explique la predilección de estas especies por colonizar el aparato respiratorio<sup>69</sup>.

Al relacionar el aislamiento de *Candida* spp de la boca y el factor predisponente se ha reportado que en la cavidad bucal de pacientes diabéticos,

*C. albicans* se aisló en el 60 y 89% <sup>115</sup>; estos autores sugieren que la DM es un factor de riesgo en el desarrollo de la candidosis bucal.

Bartholomew y cols <sup>13</sup>, analizaron 60 pacientes con DM insulina-dependientes, de los cuales el 70% presentaron candidosis bucal. Estos datos coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde el 70% de los pacientes analizados con candidosis bucal presentaron DM2 como factor predisponente. Sin embargo, en el estudio realizado por Sousa y cols <sup>106</sup> de 196 pacientes, divididos en diabéticos y no diabéticos, el 30.5% de los pacientes DM2 y el 36% de los no diabéticos presentaron candidosis bucal, por lo que se concluyó que no hubo relación significativa entre DM2 y candidosis bucal.

En otra investigación, Willis y cols <sup>126</sup> estudiaron 414 pacientes diabéticos en tratamiento con insulina, en el 77% se aislaron de cavidad bucal, diversas especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* la principal especie y en este grupo de pacientes aislaron por primera vez a *C. dubliniensis*. A pesar de la alta relación entre candidosis bucal en pacientes con DM, no se consideró que sea el único factor que determinó el desarrollo de *Candida*, sino una combinación de factores.

A diferencia de otros estudios <sup>111,23</sup> donde se señaló que *C. dubliniensis* se aísla en un alto porcentaje de la boca de los pacientes con SIDA, en este estudio no hubo relación en la candidosis bucal, SIDA y el desarrollo *C. dubliniensis*, probablemente debido a que los pacientes con VIH recibieron un tratamiento adecuado.

De acuerdo a las diversas publicaciones, el embarazo se ha considerado un factor predisponente de la vulvovaginitis por *Candida*, especialmente en pacientes que rebasan las 28 semanas de embarazo, debido al alto nivel de glucógeno producido por el epitelio vaginal estimulado por los altos niveles estrógenos gestacionales <sup>12</sup>; en el presente trabajo el periodo gestacional de las pacientes que presentaron vulvovaginitis por *Candida* fue cercano a las 32 semanas. *Candida albicans* es la especie que causa el 80 al 90% de esta forma clínica, seguida por *C. glabrata* (5-15%) <sup>12</sup>. En el estudio realizado por Rivera-Sánchez y cols., analizaron 631 mujeres entre 14 y 65 años, donde la especie más

frecuente fue *C. albicans* (39%), seguida de *C. glabrata* (35.9%), en 11 (2.14%) de los casos se encontró asociación de ambas especies <sup>91</sup>. A diferencia de este resultado, en el presente trabajo la asociación de estas dos especies fue del 20% en las pacientes que presentaron esta forma clínica de candidosis. Otro hallazgo interesante fue el aislamiento de *C. dubliniensis* de una paciente femenina de 48 años cuyo factor predisponente fue menopausia.

*Candida albicans* y *C. dubliniensis* son morfológicamente similares y con las pruebas de uso habitual no es posible diferenciarlas, por este motivo creció el interés por diseñar medios de cultivo para su diferenciación <sup>6,56,3</sup>; sin embargo, los resultados de las pruebas presentaron sensibilidad y especificidad variable y con resultados poco reproducibles, por lo que la identificación fenotípica de estas dos especies requiere de más de una prueba. En este estudio, se propusieron tres medios de cultivo (agar tabaco, agar Staib y agar caseína modificado) y la prueba de termotolerancia, para la diferenciación de las dos especies en base a sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas, con lo que se logró la diferenciación e identificación de *C. dubliniensis*.

A diferencia de los resultados obtenidos por Khan y cols <sup>44</sup>, en agar tabaco, donde los aislados de *C. dubliniensis* producen colonias de superficie rugosa y rodeadas por un halo velloso y abundantes clamidoconidios. En el presente trabajo las colonias de esta especie mostraron dos morfotipos, uno de tipo crateriforme y otro de tipo cerebriforme; el color en ambos morfotipos fue marrón intenso opaco, en contraste a la combinación de color amarillo-marrón que describió Khan <sup>44</sup>. En el presente estudio, las características fundamentales para diferenciar los aislados de *C. albicans* de los de *C. dubliniensis* en este medio de cultivo fue la superficie lisa y la nula o escasa producción de clamidoconidios, hechos que coinciden con los resultados de Khan.

En el presente trabajo, en agar Staib, las colonias de *Candida* mostraron diferenciación en la formación de un halo velloso alrededor de las colonias y la producción abundante de clamidoconidios, características que predominaron en los aislados de *C. dubliniensis*; a diferencia del reporte de Staib y Araste <sup>107</sup>,

donde las colonias de esta especie presentaban superficie rugosa y abundantes clamidoconidios.

Los resultados obtenidos en agar caseína modificado, coincidieron con los descritos por Mosca y cols <sup>71</sup>, donde los clamidoconidios producidos en los aislados de *C. dubliniensis* son abundantes, distribuidos y ordenados. La modificación en el porcentaje (10%) de la cantidad de leche descremada adicionada al medio, facilitó la observación de los clamidoconidios.

La prueba de termotolerancia fue uno de los criterios importantes de diferenciación entre ambas especies. Esta prueba ha sido utilizada por otros autores para diferenciar a estas dos especies <sup>80,11</sup>. En el presente estudio, de todos los aislados, 86 correspondieron a *C. albicans* y 5 a *C. dubliniensis*, de acuerdo con los criterios de crecimiento y ausencia de crecimiento a 45 °C, respectivamente <sup>108</sup>.

Las pruebas fenotípicas pueden ser parámetros presuntivos de utilidad para la identificación de ambas especies en los laboratorios clínicos microbiológicos. En el presente estudio, basados en los parámetros antes mencionados, la frecuencia de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fue del 95 y 5%, respectivamente. Esta frecuencia coincide con lo descrito en la literatura, donde el rango de frecuencia en diversos estudios fue para *C. albicans* del 32-98% y para *C. dubliniensis* del 1-8% <sup>19,103,101,70,37,81,95,80,84,34,120,62,16</sup>. Aparentemente esta diferencia está relacionada con la menor tolerancia de *C. dubliniensis* al estrés del microambiente, lo que traduce que es menos competitiva para colonizar y causar infección en el humano.

Existen diversas publicaciones sobre la actividad de los antifúngicos sobre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En el presente estudio, los antifúngicos que mostraron la mejor actividad frente a estas dos especies fueron AMB, CSF y ANF. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por Manzano y cols <sup>61</sup>, donde los aislados de ambas especies fueron sensibles a AMB; al igual que los resultados de Loza y cols <sup>58</sup>, quienes únicamente observaron la sensibilidad de este fármaco frente a *C. albicans*, con resultados similares. Por el

contrario, en el estudio de Ricciardi y cols <sup>88</sup>, la resistencia a AMB mostrada por *C. albicans* y *C. dubliniensis* fue del 7 y 25%, respectivamente.

Por otro lado, la resistencia de *C. albicans* frente a los azoles registrada en la literatura ha sido variada, el rango reportado fue para ITZ de 8 al 43% <sup>4,61,62,88</sup>; para KTZ de 8 al 18% <sup>58,21,62</sup> y para PZC del 32% <sup>93</sup>. En el presente estudio la resistencia obtenida fue similar a lo descrito en la literatura, del 25, 20 y 12% para ITZ, PZC y KTZ, respectivamente. La resistencia observada con FLZ, fue del 3% en los 86 aislados de *C. albicans*, similar al descrito por Manzano <sup>62</sup> y Loza <sup>58</sup>, en los cuales se obtuvieron en el 2.7 y 4%, respectivamente; sin embargo, otros autores han encontrado un aumento del 11 al 22% en la resistencia de los aislados de *C. albicans* a FLZ <sup>4,21</sup>.

En *C. dubliniensis* los resultados han sido variables, ya que algunos autores han descrito que es sensible a todos los azoles que se estudiaron <sup>93,62</sup>. Sin embargo, Manzano <sup>61</sup> y Ricciardi <sup>88</sup> encontraron que *C. dubliniensis* fue resistente a ITZ en un 50 y 25%, respectivamente. Estos datos coinciden con lo observado en el presente trabajo, donde esta especie presentó resistencia a ITZ en un 87%, a VRZ en el 60%. Fue evidente que en ninguno de los aislados mostró resistencia frente a FLZ, dato que coincide con otros autores <sup>62,88</sup>. Cabe mencionar que Quindós y cols <sup>85</sup> encontraron que los aislados de *C. dubliniensis* presentaron resistencia a FLZ en el 11%.

## V. Conclusiones

1. Los medios utilizados (AT, AS y ACM) fueron de utilidad basado en los criterios fenotípicos para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, donde *C. dubliniensis* presentó abundante producción de clamidoconidios dispuestos en racimo en AT, AC y AS; colonias rugosas, de color marrón en AT; halo vellosa largo alrededor de las colonias en AT y AS; y la ausencia de crecimiento a 45° C.

2. La preparación de estos medios es sencilla, rápida, económica y podrían ser usados en los laboratorios clínicos microbiológicos como técnica para la diferenciación presuntiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, que es fundamental para conocer su distribución geográfica, anatómica, su papel patógeno y la sensibilidad y/o resistencia desarrollada a los diversos antifúngicos.

3. No hubo diferencia entre los factores de riesgo, las formas clínicas y *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

4. La resistencia de *C. albicans* a los diversos azoles fue en ITZ 24%, PZC 20%, KTZ 13% y solo el 3% de los aislados a FLZ.

5. La resistencia observada en los aislados de *C. dubliniensis* a ITZ y VRZ fue del 80% y 60%, respectivamente. Es necesario diferenciar esta especie de los aislados de *C. albicans*, para establecer el patrón de sensibilidad antifúngica.

## ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
AC	Agar caseína
ACM	Agar caseína modificado
ADS	Agar dextrosa Sabouraud
ADS-CC	Agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol
AMB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
APD	Agar papa dextrosa
AS	Agar Staib
AT	Agar tabaco
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
<i>C.d.</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
CH	CHROMagar <i>Candida</i> ®
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CSF	Caspofungina
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLZ	Fluconazol
g	Gramos
H <sup>+</sup>	Hidrógeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HM	Agar harina de maíz adicionado con Tween 80 al 1%
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los

	Trabajadores del Estado.
ITZ	Itraconazol
IVU	Infección de vías urinarias
K+	Potasio
KTZ	Ketoconazol
LLBA	Líquido de lavado bronquioalveolar
mL	Mililitros
MQ	Agua químicamente pura
Na+	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PZC	Posaconazol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDD	Sensible dosis dependiente
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSA	Secretaria de Salud y Asistencia
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida humana
VRZ	Voriconazol
W-O	Cambio fenotípico blanco opaco

## ANEXO

### Tinción de Gram

- a) Hacer un frotis y fijarlo con calor.
- b) Cubrir con cristal violeta durante un minuto y después lavar ligeramente con agua corriente.
- c) Cubrir con lugol durante un minuto y lavar con agua corriente.
- d) Decolorar con una cantidad de 10 a 20 gotas de una solución de alcohol - acetona al 50% y lavar con agua corriente.
- e) Cubrir con safranina durante 30 segundos y lavar ligeramente con agua corriente, dejar secar y observar<sup>47</sup>.

### Agar Dextrosa Sabouraud (BD BIOXON®)

Componentes:

Agar	15.0 g
Dextrosa	40.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
pH final	5.6+-0.2

Procedimiento:

En 1000 mL de agua destilada agregar 65g de medio ADS y disolver por calentamiento. Esterilizar durante 15 minutos a 121° C, dejar enfriar y verter en cajas Petri.

### Agar Dextrosa Sabouraud con Antibióticos (BD BBL™ Mycosel™)

Es un medio utilizado para el aislamiento de la mayoría de los hongos patógenos. La cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol a las bacterias.

Componentes:

Harina de soja digerida por enzimas papaicas	10.0g
Dextrosa	10.0g
Agar	15.5g
Cicloheximida	0.4g
Cloramfenicol	0.05g
pH final 6.9+-0.2	

Procedimiento:

En 1000 mL. de agua destilada agregar 36g de ADS antibiótico. Disolver por calentamiento y esterilizar durante 15 minutos a 121 °C, dejar enfriar y verter en cajas de Petri.

Agar Harina de Maíz (BD BBL™)

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Componentes:

Infusión de harina de maíz (sólidos)	2.0g
Agar	15.0g
pH final 6.0+-2.0	

Procedimiento:

En 1000 mL de agua destilada agregar 17g de agar harina de maíz y disolver por calentamiento. Posteriormente añadir 10 ml. de Tween 80, mezclar y esterilizar a 120 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar y verter en cajas de Petri.

### Filamentación en Suero

Se utiliza para diferenciar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* de otras especies de *Candida*.

Composición:

Suero humano.

Procedimiento:

Colocar una porción del crecimiento de 24 horas de la levadura en 0.5 mL de suero e incubar a 37 °C, durante dos horas. Tomar una gota de suero y observar al microscopio la presencia de tubo germinativo.

### CHROMagar Candida®

Este medio diferencia por color el de la colonia a cuatro especies del género *Candida*: *C. albicans* y *C. dubliniensis* son de color verde, *C. tropicalis* color azul, *C. krusei* color rosado con margen blanco, *C. glabrata* color morado.

Procedimiento:

En 1000 mL de agua destilada estéril agregar 47.7g de CHROMagar *Candida*® d, calentar, agitar constantemente de manera lenta hasta que la mezcla sea homogénea, llevar hasta ebullición durante 2 min. Dejar enfriar y verter a cajas de Petri.

### Agar tabaco (Khan<sup>38</sup>)

Este medio diferencia morfológicamente a *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Componentes:

Tabaco natural	50 g
Bactoagar BD BIOXON	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento:

Hervir durante 30 minutos 50g de tabaco natural en 1000 mL de agua destilada, filtrar a través de gasas y aforar al volumen inicial.

Agregar el líquido resultante a un matraz con 20g de Bactoagar y disolver por calor. Ajustar a pH de 5 y esterilizar por 15 minutos a 120 °C, dejar enfriar y verter en cajas Petri.

#### Agar Staib (Staib<sup>102</sup>)

Este medio diferencia morfológicamente a *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Componentes:

Guizotia abyssinica	50 g
D-glucosa	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Creatinina	1 g
Bactoagar BD BIOXON	15 g

Procedimiento:

Pulverizar la semilla, agregar a 1000 mL de agua destilada y hervir durante 30 minutos, filtrar a través de gasas y aforar al volumen inicial.

Agregar el líquido a un matraz que contenga el resto de los componentes, disolver por calor, ajustar a pH de 6 y esterilizar por 15 minutos a 120 °C. Dejar enfriar y verter en cajas Petri.

#### Agar caseína modificado

Este medio diferencia morfológicamente a *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Componentes:

Leche semidescremada (Svelty®)	1 g
Bactoagar (BD®)	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento:

Por separado A) disolver 1 g de leche en 500 mL de agua destilada. B) Disolver por calor los 15 g de agar en 500 mL de agua destilada. Ajustar pH a 8. Esterilizar por 15 min a 120 °C. Dejar enfriar y vaciar A en B. Verter en cajas de Petri.

Agar Papa Dextrosa (BD BIOXON®).

Componentes:

Infusión de papa (sólidos)	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH final 5.6+-0.2	

Procedimiento:

En 1000 mL de agua destilada agregar 39g de APD. Disolver calentando. Ajustar a pH de 5.6 y esterilizar durante 15 minutos a 120 °C.

## Bibliografía:

1. Ainsworth GC. Introduction to the history of mycology. Cambriedge University Press, 1976. pp 359.
2. Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid ferric citrate agar. J Clin Microbiol 2001; 39: 323-327.
3. Al-Mosaid A, Sullivan D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal´s Agar. J Clin Microbiol 2003; 41: 4787-4789.
4. Alvarado PD, Diaz JMC, Silva V. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from invasive mycoses. Influence of growth inhibition percentage to determine minimal inhibitory concentration. Rev Med Chile 2002; 130: 416-423.
5. Alvarez-Suárez ML, Sánchez-Tabar L, Bisecas-Fernández MJ, Fernández-Alvarez MA. Agujero retiniano en polo posterior secundario a un foco de retinitis por *Candida*. Arch Soc Esp Oftalmol 2005; 80: 421-424.
6. Alves SH, Loreto ES, Linares CE, Silveira CP, Scheid LA, Pereira DI, Santuario JM. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48: 119-121.
7. Arenas R. Micología médica ilustrada. 3ª edición. Mc Graw Hill Interamericana, 2008. pp 425.
8. Arroyo-Escalante S, Moncada D, Arenas R, Vick-Fragoso R. Determinación de las especies de *Candida* en muestras respiratorias de pacientes con ventilación mecánica. Rev Hosp Gral Dr. M Gea González 2007; 8: 5-9.
9. Azzam-W M, Cermeño-Vivas JR, Orellán-García Y, Penna SJ. Vulvovaginitis por *Candida* spp y *Trichomonas vaginalis* en mujeres sexualmente activas. Invest Clín 2002; 43: 3-13.
10. Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patient. Arch Iran Med 2010; 13: 282-287.

11. Barnett J, Payne R, Yarrow D. Yeast: Characteristics and identification. Cambridge University Press, 2000. pp 1150.
12. Barrenetxea G. Vulvovaginitis candidiásica. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 22-24.
13. Bartholomew GA, Rodu B, Bell D. Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: A thorough analysis. Diabetes care 1987; 10: 607-612.
14. Bianchi DE. Small colony variant in *Candida albicans*. J Bacteriol 1961; 82: 101-105.
15. Bodey GP. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment. New York: Reven Press, 1993. pp 137.
16. Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Cordoba S, Isla MG, Murisengo OA, Szusz W, Vivot W, Davel G. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia in Argentina: Identification by a novel multiplex PCR and comparison of different phenotypic methods. Mycopathologia 2011; 172: 407-414.
17. Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. American Society for Microbiology Press, 2002. pp 451.
18. Castro C, Martín E. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del genero *Candida: Candida dubliniensis*. Control Calidad SEIMC. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. En: <https://seimc.org/control/revisiones/micologia/Cdublinien.pdf>.
19. Ceballos SA, Gaitán Cepeda LA, Ruesga MT, Ceballos GL, Quindós G. Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con SIDA sometida a terapia antirretroviral altamente activa. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 141-145.
20. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183: 5385-5394.
21. Chunchanur SK, Nadgir SD, Halesh LH, Patil BS, Kausar Y, Chandrasekhar MR. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. Indian J Pathol Microbiol 2009; 52: 501-504.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3, 2008.

23. Coleman C, Sullivan D, Bennett Désirée E, Moran Gary P, Barry Hugh J, Shanley Diarmuid B. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. Editorial Review, AIDS 1997; 11: 557-567.
24. Cortés LJA, Russi NJA. Equinocandinas. Rev Chil Infect 2011; 28: 529-536.
25. De Backer MD, Nelissen B, Logghe M, Viaene J, Loonen I, Vandoninck S, de Hoogt R, Dewaele S, Simons FA, Verhasselt P, Vanhoof G, Contreras R, Luyten WH. An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. Nat Biotechnol 2001; 19: 235-241.
26. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor schimmel cultures, Utrecht, the Netherlands, 2000.
27. Diomedi P. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. Rev Chil Infect 2004; 21: 89-101.
28. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; 11: 30-36.
29. Epidemiología. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2009; 26(36), del 6 al 12 de septiembre.
30. Eraso E, Sahand IH, Villar-Vidal M, Marcos C, Dolores Moragues M, Madariaga L, Pontón J, Quindós G. Usefulness of *Candida* ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. Med Mycol 2006; 44: 611-615.
31. Figueras C, Díaz de Heredia C, Navarro ML, Roselló E, Alvez F. Infección fúngica invasiva (IFI): actualización. Asociación Española de Pediatría 2008.
32. Galagan JE, Henn MR, Ma LJ, Cuomo CA, Birren B. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. Genome Res 2005; 15: 1620-1631.
33. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xilose and alphasamethil-D-glucoside as determined with the API 20CAUX and Vitek YBC systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3804-8.
34. García Muñoz Carina. Frecuencia de *Candida dubliniensis* y su sensibilidad antifúngica, obtenidas de pacientes del Centro Medico Nacional Siglo XXI. IMSS. Tesis de Posgrado. Facultad de Medicina, UNAM. 2010.

35. Ge YP, He GX, Lin T, Lu GX, Shen YN, Leu WD. First isolation of *C. dubliniensis* from oral cavities of dermatological patients in Nanjing China. *Mycopathologia* 2011; 172: 465-471.
36. Gómez Raja J. Análisis del papel de *RAD52* en la estabilidad genómica de *C. albicans*. Universidad de Extremadura. Facultad de Ciencias. Dpto. Anatomía, Biología Celular Y Zoología. Tesis doctoral 2007.
37. Handog EB, Dayrit JF. Mycology in the Philippines, Revisited. *Jpn J Med. Mycol.* 2005; 46: 17-76.
38. Heiti Paldrok. Medical Mycology in scandinavia and Finland during a century, from 1841 to 1940. *Mycopathologia* 1940; 12: 289-348.
39. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Álvarez R, Bazan-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud Pública Mex* 2003; 45: 455-460.
40. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 14–9.
41. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran G, Saunders D, Harris D, Aslett M, Barrell J, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot P, Goodwin TJ, Quail MA, Maquillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream M, Renauld H, Spiering M, Tivey A, Gow N, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M. Comparative genomics of the fangal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res* 2009; 19: 2231-2244.
42. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7329-7334.
43. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. El Manual Moderno 10ª edición. México 2007.
44. Khan ZU., Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco Agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4796-4798.

45. Khan ZU, Ahmad S, Chandy R, Joseph L. A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72: 285-287.
46. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Al-Sweih N, Chandy R. Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 182-185.
47. Kibber CC, Ainscough S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Sohnson EH, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA. Management and outcome of blood stream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect* 2003; 54: 18-24.
48. Kumamoto CA. *Candida* Biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 608-611.
49. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1992. pp 866.
50. Lephart PR, Chibana H, Magee PT. Effect of the major repeat sequence on chromosome loss in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 733-741.
51. Loder L. *The Yeasts: Taxonomic study*, 2ª edición. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1970.
52. Lok R. Huertos caseros tradicionales de América Central: características, beneficios e importancia, desde un enfoque multidisciplinario. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 1998. pp 234.
53. López Rubén, Méndez Luis J., Hernández Francisca, Castañón Roció. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnostico de laboratorio*. 2ª edición. México: Trillas, 2004. pp 192.
54. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernandez F. *Principios de Micología Médica. Clínica, Diagnostico y Terapéutica*. 1a ed. Méndez Editores, 2009. pp 279.
55. Loreto ES, Bolzan AR, Linares CE, Boff E, Santurio JM, Alves SH. Evaluation of 5 new media containing extracts of seeds applied to *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 191-193.

56. Loreto ES, Posthay P, Alves S L, Santurio D, Morais SJ, Alves SH. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on rosemary extract agar and oregano extract agar. J Clin Lab Anal 2008; 22: 172-177.
57. Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, ZeniG, Santurio J, Alves SH. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and phenotypic methods for identification. Mycopathologia 2010; 169: 431-443.
58. Loza A, Reséndiz J, Salgado R, Bernal R. Aislamiento, identificación y patrones de susceptibilidad de cepas de *Candida* causantes de infección sistémica en un hospital infantil. Químico Farmacéutico Biólogo, Investigación Universitaria Multidisciplinaria 2009. En: [www.usb.edu.mx/downloads/publicaciones/No4/r04\\_art06.pdf](http://www.usb.edu.mx/downloads/publicaciones/No4/r04_art06.pdf).
59. Luna CS, Segundo ZC. Aislamiento e identificación de levaduras aisladas de leche de vacas con mastitis clínica crónica. XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. 2004.
60. Mackinnon J, Allende RC. The so-called genus *Candida*. Berkhout, 1923. J Bacteriol 1945; 49: 317-334.
61. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Zavala-Velásquez N, Méndez-Tovar LJ, Naquid-Narváez JM, Torres-Rodríguez JM, López-Martínez R. Candiduria en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Sensibilidad antifúngica *in vitro*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008; 46: 603-610.
62. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez JM, Cortés-González E, Fernández R, López-Martínez R. Levaduras causantes de onicomycosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. Rev Iberoam Micol 2011; 28: 32-35.
63. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México, Gac Méd Méx 2008; 144: 23-26
64. Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol 2006; 138-142.

65. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui A, Kelley JI, Meoks VI, Merz WG, Falkler WA. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod* 1999; 88: 573-580.
66. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, García-Muñoz C, Hernández-Galván MS, Hernández JR. *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* sensibilidad antifúngica en aislados de pacientes del Centro Medico Nacional Siglo XXI. VI Congreso Nacional de Micología Médica 2010.
67. Merz WG, Hay RJ. Topley and Wilson`s Microbiology and microbial infections. Medical Mycology. Mitchell TG: Kingdom Fungi, fungal phylogeny and systematics. Euston Road, London. Hodder Arnold, 2005. pp 869.
68. Miron D, Horowitz Y, Lumelsky D, Hanania S, Colodner R. Dual pulmonary infection with *Candida dubliniensis* and *Aspergillus fumigatus* in a child with chronic granulomatous disease. *Journal of Infection* 2005; 50: 72-75.
69. Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad S. Prevalence of *Candida dubliniensis* among cancer patients in Kuwait: a 5 year retrospectives study. *Mycoses* 2011; 54: 29-34.
70. Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Pontón J. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en un adolescente con estomatitis protésica. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10: 25-31.
71. Mosca O, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. Casein Agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1259-1262.
72. Mühlischlegel FA, Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Molecular and Cellular Biology* 1997, 17: 5960-5967.
73. Mujica M.T. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 107-112.
74. Mycek MJ, Harvey RA. Farmacología. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana 2004.
75. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard

- M27A. Villanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
76. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Medica Panamericana 2009. pp 656.
  77. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
  78. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 12-16.
  79. Paz M, Kahl S, Escovich L, Garófalo F, Bulacio L, López C. Presencia de hongos levaduriformes en cavidad oral en pacientes con tratamiento oncológico por cáncer de cabeza y cuello. Caracterización fenotípica. Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio 2007. En: <http://www.villavicencio.org.ar/pdf07/141.pdf>.
  80. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. Rev Argent Microbiol 2008; 40: 211-217.
  81. Pirottal MV, Garland SM. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne Australia, before and after treatment with antibiotics. J Clin Microbiol 2006; 44: 3213-3217.
  82. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 78-82.
  83. Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, Albert D, Ambroise-Thomas P, Cano J, Carrillo-Muñoz AJ, Gené J, Pinel C, Stevens DA, Sullivan DJ. Emerging pathogens. Med Mycol 2000; 38: 225-236.
  84. Prieto Santa Anna LM. Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA: aspectos clínicos, micológicos y terapéuticos en Puebla, México. Rev Cubana Med Trop 2006; 58: 173-180.
  85. Quindós G. Candidemias y candidiasis invasivas nosocomiales. Med Clin (Barc) 2010; 134: 17-19.

86. Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP, Salgado J, Alonso Vargas R, Rodrigo JM, Ruesga MT, Valverde A, Pemán J, Cantón E, Martín-Mazuelos E, Pontón J. *In vitro* susceptibility of *C. dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy* 2000; 46: 395-401.
87. Rabinovich GA. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Argentina: Panamericana 2004. pp 614.
88. Ricciardi AM, Ricciardi R, Danzi M, Mungiguerra M, Pisano L, Marino A. Attività *in vitro* del voriconazolo e di altri agenti antimicotici nei confronti di 138 isolati clinici di *Candida* spp *Le Infezioni in Medicina* 2009; 1: 24-27.
89. Rimek D, Fehse B, Göpel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 2007; 51: 205-208.
90. Rippon JW. Infecciones oportunistas. Levaduras: Candidiasis y levaduras patógenas. Tratado de Micología Médica. 3ª edición. Interamericana McGraw-Hill 1988.
91. Rivera-Sánchez R, Flores-Paz R, Arriaga-Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 634-636.
92. Rodríguez OJ, Miranda TJ, Morejon LH, Santana GV. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol* 2002. En: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072002000200007&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072002000200007&script=sci_arttext&tlng=en).
93. Rubio Calvo MC, Gil J, Ramírez de Ocariz I, Benito R, Rezusta A. Actividad *in vitro* de fluconazol, voriconazol y posaconazol frente a *Candida* spp *Rev Esp Quimioter*. 2003; 6: 227-232.
94. Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5768-5770.

95. Sahand IH, Ortiz R, Pemán J, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Identificación rápida de *Candida dubliniensis* mediante la prueba Bichro- Dubli. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 25: 576-578.
96. Sanabria R, Samudio M, Farina N, Laspina F, Ortellado de Canese J, Arbizu Ledesma G, Laconich Romero M, Rodríguez H. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados e inmunocomprometidos en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2006; 4: 45-49.
97. Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 601-613.
98. Scheid LA, Nunes DA, Soares IH, Loresto ES, Santurio JM, Alves SH. DRBC agar: a new tool for *Candida dubliniensis* identification. *Folia Microbiol (Praha)* 2010; 55: 155-158.
99. Sebti A, Kichn TE, Perlin D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, Pork S, Sejekonitz KA. *Candida dubliniensis* at a cancer center. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1034-1038.
100. Segal E, Elad D. *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. En: Ajello L, Hay RJ. *Medical Mycology*. London: Arnold, 1998: 423-460.
101. Silva V. Prevalencia de serotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 46-51.
102. Silveira-Gomes R, Sarmiento DN, Espirito-Santo EP, Souza Nde O, Pinto TM, Marques-da-Silva SH. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44: 457-460.
103. Slavin MA y Australian Mycology Interest Group. The epidemiology of candidemia and mould infections in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 3-6.
104. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4626-4628.

105. Soll DR, Anderson J, Bergen M. The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. Prasad (ed.), *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer Verlag, Berlin, Germany 1991.
106. Sousa MG, Costa A, Roncalli AG. Clinical study of the oral manifestations and related factors in type 2 diabetics patients. *Braz J Otorhinolaryngol* 2011; 77: 145-152.
107. Staib F, Arastéh K. Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 2001; 44: 23-27.
108. Sullivan DJ, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 329-334.
109. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Ten years on. *FEMS Microbiol Letters* 2005; 253: 9-17.
110. Sullivan DJ, Moran J, Pinjon E, Al-Mosaïd A, Stokes CH, Vaughau C, Coleman DC. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS yeast Res* 2004; 4: 369-376.
111. Sullivan DJ, Westerneng, Haynes, Bennett, Coleman DC. *Candida dubliniensis* spp nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-1521.
112. Tejada A, Hernández M, Solís J. La ciencia y el hombre. El microsмос biológico: ¿aliado o adverso de la salud humana?. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana* 2003. En: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num3/articulos/microcosmos/index.htm>.
113. Titelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Neumann D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1599-1608.
114. Torres-Rodríguez JM. Micosis que afectan piel y mucosas. DOYMA 1991.
115. Ugalde Iglesias CM. Prevalencia de especies de *Candida* en la cavidad oral en pacientes diabéticos tipo 2. Universidad de Granada 2008.

116. Ulloa M, Hanlin RT. Nuevo diccionario ilustrado de micología. St. Paul, Minn: American Phytopathological Society, 2006. pp 672.
117. Velasco M. Alfonso. Farmacología Fundamental. McGraw-Hill Interamericana de España 2003.
118. Velásquez D. Prevalencia y caracterización de candidosis bucal, en pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), de la Asociación Gente Nueva. Guatemala 2004.
119. Villanueva-Reyes J, Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. Rev Mex Micol 2007; 25: 91-104.
120. Villarroel Rodríguez, Santa Cruz Rodríguez. Identificación de especies de levaduras del género *Candida* aislados de exudados vaginales de pacientes en el Hospital Materno Germán Urquidí. Gaceta Médica Boliviana 2011; 34: 84-86.
121. Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G. Evaluación de la capacidad de formación de biopelícula de aislamientos clínicos de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011; 29: 660-665.
122. Vinitha Mohan, Mamatha Ballal. Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. W J Med Sci 2007; 2: 46-48.
123. Vinitha Mohan, Mamatha Ballal. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 208-210.
124. Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari B. Molecular identification of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 1995; 33: 205-207.
125. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. Ann Rev Microbiol 2007; 61: 529-553.
126. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell RM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. Diabet Med 1999; 16: 675-9.
127. Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. J Glob Infect Dis 2011; 3: 357-60.