

## Comunicación breve

Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Propuesta de una secuencia de identificación.

RECIBIDO: 01/06/2011

ACEPTADO: 11/10/2011

Bartoli M. Z.<sup>1</sup> • Cingolani B.<sup>1</sup> • García-Effron G.<sup>1,2</sup> •  
Gamarra S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral). CONICET.

<sup>2</sup>Cátedra de Parasitología y Micología. - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral).

\*Correspondencia: Dra. Soledad Gamarra. Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular. Cátedra de Parasitología y Micología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje el Pozo, S3000ZAA Santa Fe, Argentina. Teléfono: 0342-4575209 int. 135. E-mail: mgamarra@fbcb.unl.edu.ar.

**RESUMEN:** *Candida dubliniensis* es un patógeno emergente que fue descrito por primera vez en 1995, comparte muchas características fenotípicas con *Candida albicans* y por lo tanto puede ser identificado erróneamente en los laboratorios de microbiología. En el presente trabajo se utilizaron diferentes métodos fenotípicos para poder diferenciar ambas especies con el fin de determinar cuáles son los que tienen mejor relación costo/especificidad. Se estudió la capacidad de formación de clamidoconidios en diferentes medios de cultivo (Agar Tabaco, Agar Harina de Maíz, Agar Tabaco con Tween 80, agar

Harina de Maíz con Tween 80 y Agar Tomate-Zanahoria), la actividad lipasa, la asimilación de D-xilosa, el crecimiento en Caldo Sabouraud Hipertónico y la termotolerancia. Pudimos concluir que el agregado de tween 80 a los medios de evaluación de clamidoconidios fue esencial para que sean capaces de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* y que el medio Agar Tabaco Tween 80 puede ser utilizado como medio de aislamiento primario para evaluar la existencia de infecciones mixtas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Además, proponemos el uso de al menos 3 de estos métodos (Actividad Lipasa en Medio de Opacidad, Agar Tabaco con Tween

80 y Caldo Sabouraud Hipertónico) de manera secuencial para diferenciar con una especificidad cercana al 100% entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* en un laboratorio de microbiología clínica.

**PALABRAS CLAVES:** *Candida dubliniensis*, identificación fenotípica.

**SUMMARY:** *Analysis of phenotypic methods for differentiation of Candida dubliniensis and Candida albicans. Proposal of an identification sequence.*

*Candida dubliniensis* is an emerging yeast pathogen described in 1995. *C. dubliniensis* and *C. albicans* can be misidentified because these species share multiple phenotypic characteristics. In this work, different methods were evaluated in order to establish an inexpensive and specific procedure to phenotypically differentiate these species. We evaluated the clamidoconidia production in 5 different

media (tobacco agar, corn meal agar, tobacco tween 80 agar, corn meal tween 80 agar and tomato-carrot agar), lipase activity, D-Xilose assimilation, growth in hypertonic Sabouraud broth and thermotolerance.

We concluded that the addition of tween 80 to the agarized media was essential to differentiate *C. albicans* from *C. dubliniensis* by clamidoconidia production. Moreover, the tobacco tween 80 agar could be utilized as a media for primary isolation from clinical samples for the evaluation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* mixed infections. We propose the use of 3 of these methods (lipase activity, tobacco tween 80 agar and growth in hypertonic Sabouraud broth) used sequentially for the differentiation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with almost 100% specificity.

**KEYWORDS:** *Candida dubliniensis*, phenotypical identification.

## Introducción

En 1995, Sullivan y colaboradores describieron una nueva especie del género *Candida* relacionada filogenéticamente con *C. albicans* y asociada con lesiones orales recurrentes en pacientes VIH + de Dublin (Irlanda), a la que denominaron *C. dubliniensis* (1-6). Posteriormente, esta especie fue aislada de otros tipos de muestras como orina, sangre, heces, tracto respiratorio, vagina, sistema nerviosos central y piel tanto de pacientes VIH+ como VIH- (5, 7-13). En la actualidad, *C. dubliniensis* es considerada una levadura de distribución cosmopolita y un constituyente minoritario de la micoflora humana y ambiental (4, 14).

Debido al aumento de la incidencia de *C. dubliniensis* en los últimos años, se con-

sidera importante su correcta identificación en el laboratorio. Este hecho tiene implicancias epidemiológicas y en la elección del tratamiento debido a que *C. dubliniensis* es capaz de desarrollar resistencia al fluconazol, tratamiento de elección de las infecciones por *Candida* spp. (15, 16).

Tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* comparten características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas similares, lo que hace dificultosa su diferenciación. Ambas levaduras tienen la capacidad de formar tubos germinativos y clamidoconidios, además de presentar un color similar en los medios cromogénicos (5, 17). Sin embargo, se han descrito numerosas técnicas para poner en evidencia las características fenotípicas diferenciales entre estas dos espe-

cies. Entre ellas, podemos citar: la capacidad de desarrollo a distintas temperaturas, los patrones de asimilación de carbohidratos, el color, el aspecto de las colonias y la producción de clamidoconidios en diferentes sustratos, la producción de  $\beta$  glucosidasa, la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, la coagregación con *Fusobacterium nucleatum*, la identificación electroforética en gel de almidón y SDS-PAGE, etc. (18-21). A pesar de estos esfuerzos, ninguna de estas pruebas fenotípicas resultaron ser 100% específicas y por esto, las técnicas moleculares son consideradas las más fiables para diferenciar ambas especies (13, 22-24).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar una batería de métodos fenotípicos que permitan diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* y determinar cuáles son los más fiables y económicos.

## **Materiales y Métodos**

### *Cepas*

Para la realización de este trabajo se utilizaron 8 cepas de referencia: 6 *C. albicans* (ATCC 90028, ATCC 36082, ATCC 55314, M210, M177, M205) y 2 de *C. dubliniensis* (M204, NCPF3949) conservadas en el cepario del Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Estas cepas fueron identificadas molecularmente utilizando el método de secuenciación las regiones ITS del operón ribosomal (25). Todas las cepas fueron sembradas en medio Agar Sabouraud (Britania, Buenos Aires, Arg.) sin antibióticos e incubadas a 28°C, 24 hs previas a la realización de las pruebas.

### *Pruebas Fenotípicas.*

Formación de Clamidoconidios en Medio Agar Tabaco (AT) y Agar Tabaco con Tween 80 (ATT80). Se utilizó el medio descrito por Khan y colaboradores (26) el que fue modificado para este trabajo. Brevemente, se utilizaron 50 gramos de tabaco procedentes de cigarrillos marca Marlboro® que se mezclaron con 250 ml de agua destilada y se llevaron a ebullición en fuego directo durante 30 minutos. La infusión obtenida, se dejó enfriar, se filtró, se le agregó 20 gramos de agar (Britania, Buenos Aires, Arg.), se llevó a un volumen final de 1 litro con agua destilada y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Posteriormente y para obtener el medio ATT80, se le agregaron 3 ml de Tween 80 estéril (Sigma – Aldrich, Buenos Aires, Arg.) cuando el medio de cultivo llegó a una temperatura de aproximadamente 55°C. Las placas de AT y ATT80 se sembraron por insición y se incubaron a 30°C durante 48 hs. Las colonias fueron observadas macroscópicamente, determinando: color, forma de los bordes y aspecto y microscópicamente (100X y 400X) para determinar la presencia de clamidoconidios.

Formación de Clamidoconidios en Medio Agar Harina de Maíz (AHM) y Agar Harina de Maíz Tween 80 (AHMT80). El medio AHM se preparó siguiendo los protocolos descritos previamente con modificaciones (26). Se utilizaron 40 gramos harina de maíz, la cual se hirvió en agua destilada durante 1 hora, se filtró, se le agregó 20 gramos de agar (Britania, Buenos Aires, Arg.) y se llevó a un volumen final de 1 litro con agua destilada, luego se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Una vez finalizado este proceso y para la obtención de AHMT80, se le agregaron 3 ml de Tween 80 estéril (Sigma

– Aldrich, Buenos Aires, Arg.) cuando el medio alcanzó una temperatura de 55°C. Las muestras se sembraron por incisión y las placas fueron incubadas durante 48 hs a 30°C observándose microscópicamente la presencia de clamidoconidios a 100X y 400X.

Formación de Clamidoconidios en Medio Tomate-Zanahoria (ATZ). Se preparó el medio mediante la técnica descrita por Alves y colaboradores (27) que brevemente consistió en la preparación de un extracto con 20 gramos de zanahoria rallada y 20 gramos de tomate picado sin semillas de manera similar a lo descrito para el AHM. A dicha solución, se le adicionaron 20g/l de agar y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Las muestras fueron sembradas por incisión y se siguió el mismo procedimiento que para el AT y AHM.

Detección de actividad lipasa en Medio de Opacidad (MO). Se utilizó el medio de Slikfin con modificaciones (28). Por razones prácticas, la preparación del medio se realizó en dos fracciones. La fracción 1 del medio de cultivo (1% peptona de carne, 1% cloruro de sodio, 0,1% cloruro de calcio y 1,5% agar), se autoclavó durante 15 minutos a 121°C. Posteriormente, se lo llevó a 55°C en baño termostatzado donde se le agregaron 5 ml/l de la fracción 2 (Tween 80 1% V/V estéril). Se prepararon las placas y se sembraron las muestras en círculos de 1 cm de diámetro incubándose las por 72 hs a 30°C. Pasado dicho tiempo, se observó la presencia de halo de opacidad alrededor de la colonia.

Utilización de D-Xilosa. Para esta prueba se utilizó medio base para la asimilación de azúcares (Medio de Looder). El medio de cultivo (0,5% sulfato de amonio, 0,1% fosfato de potasio monobásico, 0,05% de sul-

fato de magnesio heptahidratado y 1,5% agar) fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y fraccionado a razón de 20 ml en tubos de ensayo. Al momento de utilizarlo, el medio se fundió en horno de microondas y se lo llevó a 55°C en baño termostatzado. Entre tanto, se preparó un inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/ml (UFC: Unidades Formadoras de Colonias) (escala de Mac Farland N° 1) de la levadura en estudio. Cuando el medio de cultivo adquirió una temperatura homogénea de 55°C, se le añadió 1 ml de este inóculo por tubo, se homogeneizó y se vertió a una placa de Petri estéril. La capacidad de asimilación de azúcares se evaluó utilizando discos de papel Whatman n°5 embebidos en soluciones estériles de glucosa y D-Xilosa al 20% y secados en estufa a 37°C. En cada placa se colocó un disco de glucosa, uno de D-Xilosa y un disco control embebido con agua destilada estéril. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 hs y se observó la formación de halo de crecimiento alrededor de los discos.

Crecimiento en Caldo Sabouraud Hipertónico. Para esta prueba se prepararon tubos estériles a los cuales se le añadió 1 ml de Caldo Sabouraud suplementado con ClNa al 6,5% (29). Posteriormente se obtuvo un inóculo de 10<sup>4</sup> UFC/ml (0,5 Mac Farland diluido 1/100) en agua destilada estéril de cada una de las cepas en estudio y se inocularon 20 µl de los mismos en los tubos que contenían el Caldo Sabouraud Hipertónico. Los tubos se incubaron a 35°C durante 96 hs y se observó el crecimiento mediante la presencia de turbidez en cada tubo.

Crecimiento a 42°C y 45°C (Termotolerancia). Se evaluó el crecimiento de las cepas en medio Agar Sabouraud Glucosado (18) sembrando en este medio, 20 µl de un inóculo 10<sup>4</sup> UFC/ml (0,5 Mac Farland diluido

1/100) preparado en agua destilada estéril e incubado los tubos a 37°C, 42°C y 45°C. A las 48 hs, se evaluó el desarrollo de las colonias a estas tres temperaturas.

### Resultados

Los resultados de las distintas pruebas fenotípicas relativas a los aspectos macro y microscópicos de las colonias y características bioquímicas se encuentran resumidos en la Tabla 1.

### Pruebas de observación de la forma-

**Tabla 1.** Pruebas fenotípicas utilizadas para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Pruebas	Resultados	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<b>Formación de CL</b>		
Agar Tabaco	Aislados y terminales.	Agrupados en pares, tripletes o racimos.
Agar Tabaco T80	No	Agrupados en pares, tripletes o racimos.
Agar Harina de Maíz	Aislados y terminales.	Agrupados en pares, tripletes o racimos.
Agar Harina de Maíz T80	Aislados y terminales.	Agrupados en pares, tripletes o racimos.
Agar Tomate-Zanahoria	No	No
<b>Aspecto y color de la colonia</b>		
Agar Tabaco	Blanca, lisa	Dorada, rugosa con borde irregular (flecós)
Agar Tabaco T80	Blanca, lisa	Dorada, rugosa con borde irregular (flecós)
Medio Opacidad	Presencia de halo opaco alrededor de la colonia.	No
Asimilación de D-Xilosa	Presencia de halo de crecimiento alrededor del disco.	No
Caldo Saubouraud Hipertónico	Crecimiento significativo. Presencia de turbidez.	No se evidencia crecimiento.

CL: Clamidoconidios. T80: Tween 80.

**ción de clamidoconidios.** En este trabajo, analizamos la capacidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* de formar clamidoconidios utilizando 5 medios de cultivos distintos. En los medios AT, AHM y AHMT80, ambas especies produjeron clamidoconidios. La diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se basó en la diferencia relativa en la cantidad de clamidoconidios que produjo cada especie. Así, en *C. dubliniensis*, los clamidoconidios fueron abundantes y en algunas cepas

se presentaron formando racimos (Fig. 1E) mientras que en *C. albicans*, estas estructuras fueron escasas e individuales (Fig. 1F). Por el contrario, cuando utilizamos el medio ATZ, no se observaron clamidoconidios en ninguna de las especies incluso con el agregado de tween 80 al medio de cultivo. Por otro lado, en este trabajo introdujimos una modificación al medio AT originalmente propuesto por Khan y col. (26). Dicha innovación consistió en el agregado de 0,3% de

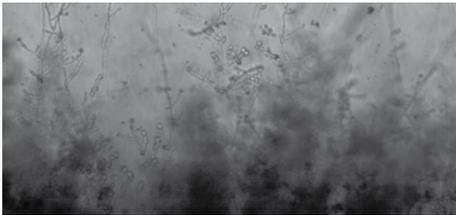
Tween 80 que permitió mejorar la diferenciación fenotípica entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* tanto macro como microscópica. Al analizar el aspecto macroscópico de las colonias de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en el medio ATT80 se observaron diferencias notorias, las *C. dubliniensis* estudiadas presentaron colonias rugosas, doradas y de bordes irregulares con abundante micelio alrededor de las mismas (presencia de flecos), mientras que las colonias de *C. albicans* fueron blancas y lisas y no se observó micelio a simple vista. En el aspecto microscópico la producción de clamidoconidios y

micelio también fue diferencial, en el caso de las *C. dubliniensis* el micelio y los clamidoconidios fueron abundantes y, estos últimos, se agruparon en forma de racimos de uva con entre 3 y 9 clamidoconidios saliendo de un mismo protoclamidoconidio (estructura que da origen a los clamidoconidios) (Fig. 1A, 1C). En cambio, la producción de micelio fue menor en las cepas de *C. albicans* y no se pudo evidenciar la presencia de clamidoconidios (Fig. 1B, 1D).

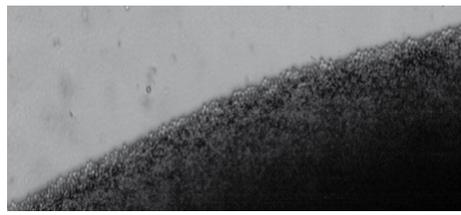
**Pruebas fenotípicas donde se evidencia crecimiento.** Todas las pruebas fenotípicas de diferenciación entre *C. albi-*

**Figura 1.** Observación microscópica de clamidoconidios. A y B Agar Tabaco con Tween 80 observación directa de la placa a 400X. C y D Agar Tabaco con Tween 80 directo del cultivo a 400X. E y F Agar Harina de Maíz observación directa de la placa a 400X. A, C y E *C. albicans*. B, D y F *C. dubliniensis*.

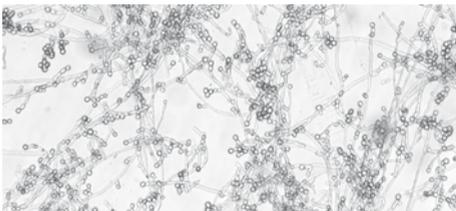
**Figura 1A.**



**Figura 1B.**



**Figura 1C.**



**Figura 1D.**



**Figura 1E.**



**Figura 1F.**



*cans* y *C. dubliniensis* en las que se evaluó crecimiento incluyeron la asimilación de D-Xilosa, las pruebas de crecimiento en Sabouraud Hipertónico y las pruebas de termotolerancia. Las dos primeras, permitieron diferenciar ambas especies con una especificidad del 100%. Así, todas las *C. albicans* estudiadas asimilaron D-Xilosa (observación de halo de crecimiento alrededor del disco) mientras que ninguna de las 2 cepas de *C. dubliniensis* fueron capaces de utilizar este azúcar como única fuente de carbono (Fig. 2B). De igual manera, se pudo observar que todas las *C. albicans* tuvieron

un crecimiento significativo en la prueba del Caldo Sabouraud Hipertónico a las 96 hs de incubación, mientras que ninguna de las *C. dubliniensis* mostraron crecimiento en el mismo tiempo de incubación (Fig. 2C). En cambio, cuando se evaluó la termotolerancia relativa de *C. albicans* respecto de *C. dubliniensis*, el 33% y el 50% de las primeras fue incapaz de crecer a 42°C y 45°C, respectivamente. En tanto que las cepas de *C. dubliniensis* crecieron solo a 37°C.

#### Detección de la actividad lipasa en MO.

Esta prueba resultó ser muy efectiva para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

#### Figura 2. Resultado de las pruebas fenotípicas.

*Prueba de actividad lipasa.* Presencia de halo de opacidad alrededor de la colonia de *C. albicans*.

*Prueba de asimilación de D-Xilosa de C. albicans.* Presencia de halo de crecimiento alrededor del disco de Glucosa (halo más grande) y del disco de D-Xilosa

*Prueba en Caldo Sabouraud con 6.5% de ClNa.* Crecimiento significativo de *C. albicans* que se evidencia por la presencia de turbidez.

Figura 2A.



Figura 2B.

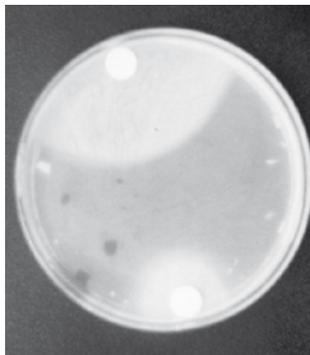
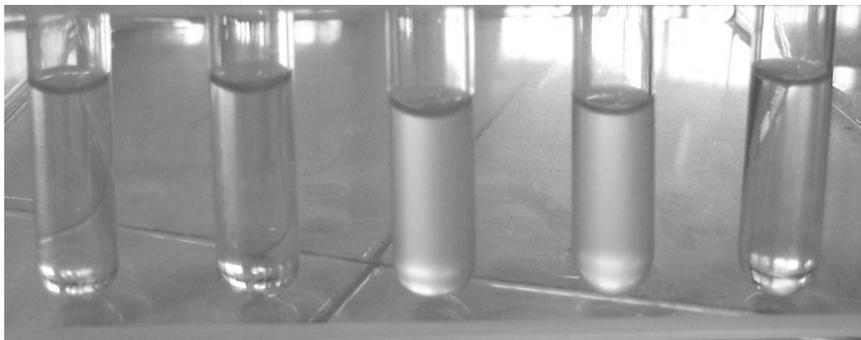


Figura 2C.



Todas las *C. albicans* estudiadas produjeron un halo opaco alrededor de la colonias demostrando que esta especie es capaz de desdoblar los fosfolípidos que componen el Tween 80, mientras que esta actividad enzimática no fue evidente en *C. dubliniensis* (Fig. 2A). Este método además presentó la ventaja de ser de simple y de fácil obtención de los resultados ya que no es necesaria la observación microscópica y que en una misma placa se pudieron evaluar hasta 12 cepas.

### Discusión

A pesar de la estrecha relación filogenética que hay entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, todavía hay poca información disponible sobre la epidemiología y la importancia clínica de esta especie. *C. dubliniensis* ha sido implicada en enfermedades fúngicas invasoras que son refractarias al tratamiento con fluconazol, por lo que su correcta identificación es una tarea importante en los laboratorios de Micología Clínica (30). Para ello, se han propuesto numerosos métodos fenotípicos pero ninguno tiene, aisladamente, un 100% de especificidad y por lo tanto la identificación definitiva depende de los métodos moleculares (31).

Varios autores han demostrado que los medios que contienen extractos de semillas y plantas tales como tabaco (26), harina de maíz, jugo de tomate (27) y extracto de semilla de girasol (32, 33) bajo ciertas condiciones de cultivo son capaces de diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la observación macro y microscópica. Además, demostraron que la presencia de 2 o más clamidoconidios originados desde un protoclamidoconidio se puede considerar como un marcador específico de la espe-

cie *C. dubliniensis*. En este trabajo pudimos corroborar esta afirmación y además, comprobamos que la modificación que introdujéramos al medio AT de Khan permite evidenciar diferencias macroscópicas entre las colonias de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*. Esto convertiría al medio ATT80 en medio que podría utilizarse para el aislamiento primario de *Candida* spp. que serviría para evidenciar infecciones mixtas producidas por *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Así, si se observan colonias doradas de borde irregular con flecos, estaríamos en presencia de *C. dubliniensis*, mientras que las colonias blancas y con borde liso serían características de *C. albicans*. Por otro lado, y utilizando el mismo medio de cultivo, se pudo diferenciar estas especies inequívocamente con una simple observación microscópica. En este medio *C. dubliniensis* presentó micelio abundante y numerosos clamidoconidios que se originaban de un único protoclamidoconidio, mientras que *C. albicans* no presentó clamidoconidios. Cabe aclarar que la inexistencia de clamidoconidios en *C. albicans* no fue descrita en los trabajos originales donde utilizaron AT (26). En nuestra experiencia, se necesitó del agregado de Tween 80 al medio AT como condición *sine qua non* para obtener estos resultados. El bajo costo de estos medios y la facilidad de la observación al microscopio (solo se requiere un objetivo de 10x y se observa directamente la colonia en la placa) abre la posibilidad de usarlo en forma rutinaria en un laboratorio de microbiología clínica de nuestro medio. En el caso del ATZ el resultado obtenido no fue el esperado, esto se puede deber al hecho de que este es un medio realizado de forma artesanal y los componentes utilizados, como el tomate

y la zanahoria, tienen un alto nivel de variación en su composición que pueden haber influido en el desarrollo de los clamidoconidios. La prueba de producción de clamidoconidios utilizando los medios AHM y AHMT80 resultó útil para diferenciar estas especies pero la interpretación de los resultados fue, a nuestro criterio, subjetiva. Esto fue así porque la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* utilizando este medio radicó en el número de clamidoconidios observados. Así, las *C. dubliniensis* presentaron un número mayor de estas estructuras que las *C. albicans* y por lo tanto, gran parte del resultado depende del criterio y experiencia del observador. Por este motivo preferimos seleccionar el ATT80 como medio de observación de clamidoconidios.

La prueba de opacidad en el medio con Tween 80 utilizada en este estudio permitió una clara diferenciación de *C. albicans* de *C. dubliniensis* en 3 días de incubación. Siendo de esta manera un excelente medio de diferenciación de ambas especies. La hidrólisis del Tween 80 incorporado en el medio está asociada con enzimas lipolíticas producidas, en este caso, solo por *C. albicans*. El calcio incorporado al medio se une a los ácidos grasos liberados por la acción de esta enzima y forma un complejo insoluble que se visualiza alrededor de la zona de siembra (28, 34). Además, puede utilizarse una sola placa para varias muestras y no se necesita más que una observación directa de la placa para la lectura de los resultados.

Otras pruebas que podrían utilizarse son: la prueba de tolerancia a la hipertonidad (Caldo Sabouraud/CINa 6.5%) (35, 36), la formación de clamidoconidios en ATT80 y la asimilación de D-Xilosa. Alves y col. demostraron que el uso de Agar Sabouraud Hipertónico no genera falsos resultados aunque

hay que resaltar la necesidad de utilizar inoculos bajos (29). En nuestro trabajo comprobamos estas afirmaciones y pudimos concluir que es una prueba barata, fácil de realizar, reproducible y que otorga resultados consistentes.

En estudios previos se ha demostrado que *C. dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por su incapacidad de asimilar D-Xilosa (37). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron altamente satisfactorios para lograr esta diferenciación. Sin embargo, esta prueba es más costosa (debido al alto precio de la D-Xilosa) y lleva más trabajo que las otras pruebas incluidas en este trabajo. En cuanto a los otros métodos evaluados, la diferencia en la termotolerancia de estas especies como el uso de ATZ no resultaron útiles para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* ya que se observaron falsas identificaciones.

En conclusión, en el presente trabajo se evaluaron, 9 métodos con potencial para diferenciar fenotípicamente *C. albicans* de *C. dubliniensis* utilizando cepas identificadas molecularmente. Se propone el uso de manera secuencial de al menos 3 de estas técnicas. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, el medio de opacidad, el crecimiento en Sabouraud Hipertónico y la observación de clamidoconidios en ATT80 son las pruebas más adecuadas para confirmar la identificación como *C. albicans* o *C. dubliniensis* con una especificidad cercana al 100% y a un bajo costo.

### Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Dr. Sergio Guerrero por permitir el uso del ultrafreezer del laboratorio de Bioquímica Microbiana.

### Bibliografía

1. Coleman, D. C.; Sullivan, D. J.; Bennett, D. E.; Moran, G. P.; Barry, H. J.; Shanley, D. B., 1997. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* **11**: 557-567.
2. Kirkpatrick, W. R.; Revankar, S. G.; Mcatee, R. K. et al., 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3007-3012.
3. Meis, J. F.; Lunel, F. M.; Verweij, P. E.; Voss, A., 2000. One-year prevalence of *Candida dubliniensis* in a Dutch university hospital. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3139-3140.
4. Sullivan, D.; Haynes, K.; Bille, J. et al., 1997. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 960-964.
5. Sullivan, D.; & Coleman, D., 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 329-334.
6. Tintelnot, K.; Haase, G.; Seibold, M.; Bergmann, F.; Staemmler, M.; Franz, T.; Naumann, D., 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1599-1608.
7. Fotedar, R.; Al-Hedaithy, S. S., 2003. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1907-1911.
8. Marriott, D.; Laxton, M.; Harkness, J., 2001. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 479-483.
9. Melton, J.J.; Redding, S.W.; Kirkpatrick, W.R.; Reasner, C.A.; Ocampo, G.L.; Venkatesh, A.; Mealey, B.L., 2010. Recovery of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species from the oral cavity of subjects with periodontitis who had well-controlled and poorly controlled type 2 diabetes: a pilot study. *Spec. Care Dentist.* **30**: 230-234.
10. Odds, F. C.; Van Nuffel, L.; & Dams, G., 1998. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2869-2873.
11. Sebti, A.; Kiehn, T. E.; Perlin, D. et al., 2001. *Candida dubliniensis* at a cancer center. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 1034-1038.
12. Tekeli, A.; Dolapci, I.; Emral, R.; & Cesur, S., 2004. Candida carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses* **47**: 315-318.
13. Sullivan, D. J.; Westerneng, T. J.; Haynes, K. A.; Bennett, D. E.; & Coleman, D. C., 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1507-1521.
14. Nunn, M. A.; Schaefer, S. M.; Petrou, M. A.; & Brown, J. R., 2007. Environmental source of *Candida dubliniensis*. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 747-750.
15. Martinez, M.; Lopez-Ribot, J. L.; Kirkpatrick, W. R.; Coco, B. J.; Bachmann, S. P.; & Patterson, T. F., 2002. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3135-3139.
16. Moran, G. P.; Sullivan, D. J.; Henman, M. C. et al., 1997. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 617-623.
17. Eraso, E.; Sahand, I. H.; Villar-Vidal, M. et al., 2006. Usefulness of *Candida* ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med. Mycol.* **44**: 611-615.
18. Gales, A. C.; Pfaller, M. A.; Houston, A. K. et

- al., 1999. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3804-3808.
- 19.** Loreto, E. S.; Scheid, L. A.; Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Santurio, J. M.; & Alves, S. H., 2010. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia* **169**: 431-443.
- 20.** Mesa, L. M.; Arcaya, N.; Canas, O.; Machado, Y.; & Calvo, B., 2004. Phenotypic evaluation to differentiate *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**: 135-138.
- 21.** Sancak, B.; Rex, J. H.; Paetznick, V.; Chen, E.; & Rodriguez, J., 2003. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 489-491.
- 22.** Ellepola, A. N.; Hurst, S. F.; Elie, C. M.; & Morrison, C. J., 2003. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**: 379-388.
- 23.** Meyer, W.; Maszewska, K.; & Sorrell, T. C., 2001. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**: 185-193.
- 24.** Quindos, G.; Alonso-Vargas, R.; Garaizar, J.; & Ponton, J., 2000. Utility of random amplified polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**: 10-13.
- 25.** White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S. B.; & Taylor J. W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: Innis M.A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., & White T. J., "PCR protocols: a guide to methods and applications". Academic Press, Inc., San Diego, Calif.:* pp 315-322.
- 26.** Khan, Z. U.; Ahmad, S.; Mokaddas, E.; & Chandy, R., 2004. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4796-4798.
- 27.** Alves, S. H.; de Loreto, E. S.; Linares, C. E. et al., 2006. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **48**: 119-121.
- 28.** Slifkin, M., 2000. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4626-4628.
- 29.** Alves, S. H.; Milan, E. P.; de Laet, S. P.; Oliveira, L. O.; Santurio, J. M.; & Colombo, A. L., 2002. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**: 85-86.
- 30.** Pfaller, M. A.; & Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 133-163.
- 31.** Mahnss, B.; Stehr, F.; Schafer, W.; & Neuber, K., 2005. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* **48**: 55-61.
- 32.** Al, M. A.; Sullivan, D. J.; & Coleman, D. C., 2003. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4787-4789.
- 33.** Khan, Z. U.; Ahmad, S.; Mokaddas, E.; Al-Sweih, N.; & Chandy, R., 2005. Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Indian J. Med. Microbiol.* **23**: 182-185.
- 34.** Dolapci, I.; Tekeli, A.; & Arikan, S., 2004. Evaluation of the Tween 80 opacity test for detection of the lipolytic activity of various *Candida* species and its utility in differentiation of

*C. albicans* and *C. dubliniensis*. Mikrobiyol. Bul.

**38**: 429-433.

**35.** Facklam, R. R. & Collins, M. D., 1989.

Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J. Clin. Microbiol. **27**: 731-734.

**36.** Kane, J.; Sigler, L.; & Summerbell, R. C.,

1987. Improved procedures for differentiating

*Microsporum persicolor* from *Trichophyton mentagrophytes*. J. Clin. Microbiol. **25**: 2449-2452.

**37.** Salkin, I. F.; Pruitt, W. R.; Padhye, A. A.;

Sullivan, D.; Coleman, D.; & Pincus, D. H., 1998.

Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. J. Clin. Microbiol. **36**: 1467.