

Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*

*Evaluation of Diverse Phenotypic Methods for Differentiating
between Candida dubliniensis and Candida albicans*

**Camacho L., Dayana; Mata E., Sofía*;
Pardi, Germán; Pineda, Vanessa;
Roselló, Arantza y Collela, María Teresa**

Sección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical,
Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

* somae50@hotmail.com

Resumen

Candida albicans y *Candida dubliniensis* presentan una estrecha relación filogenética. La similitud de estas especies puede hacer que en un laboratorio microbiológico se identifique en forma errónea *C. dubliniensis* como *C. albicans*. El objetivo de esta investigación fue evaluar diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Se utilizaron 6 cepas control de *C. dubliniensis* y una de *C. albicans*, provenientes de colecciones reconocidas y sometidas a genotipificación. También se utilizaron 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* utilizando el medio CHROMagar *Candida* y el medio de bilis agar Feo. Los métodos evaluados fueron: agar Sabouraud dextrosa a 45°C, agar Sabouraud con NaCl al 6,5%, agar Tween 80, agar tabaco, agar Pal's, agar tomate-zanahoria y aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®). Encontramos que las técnicas más confiables para realizar la diferenciación fenotípica entre estas dos especies fueron: el agar tomate-zanahoria, el agar Pal's, el agar tabaco y la aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®). Además en este estudio, de los 70 aislados considerados como *C. albicans*, encontramos 1 (1.4%) posible *Candida dubliniensis*. Sin embargo, las pruebas de biología molecular son las más adecuadas para el diagnóstico certero de estas dos especies.

Palabras clave: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, identificación fenotípica.

Abstract

Candida albicans and *Candida dubliniensis* have a close phylogenetic relationship. The similarity between these species can cause a microbiology laboratory to identify *C. dubliniensis* erroneously as *C. albicans*. The objective of this research was to evaluate diverse phenotypic methods for differentiating between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Six control strains of *C. dubliniensis* and one of *C. albicans* from recognized collections were used and submitted to genotypification. Also, 70 isolates were used, identified as possible *C. albicans* utilizing CHROMagar *Candida* and bilis agar Feo mediums. The methods evaluated were: Sabouraud dextrosa agar at 45°C, Sabouraud agar with NaCl at 6.5%, Tween 80 agar, tobacco agar, Pal's agar, tomato-carrot agar and agglutination with latex particles (Bichro-Dubli Fumouze®). It was found that the most reliable techniques for performing phenotype differentiation between these two species were tomato-carrot agar, Pal's agar, tobacco agar and agglutination with latex particles (Bichro-Dubli Fumouze®). Of the 70 isolates considered to be *C. albicans*, one (1.4%) possible *Candida dubliniensis* was found. Nevertheless, molecular biology tests are the most appropriate means for achieving an accurate diagnosis of these two species.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, phenotypic identification.

Introducción

Candida dubliniensis fue identificada como una nueva especie por Sullivan y cols. en Dublín (Irlanda) en 1995, durante el desempeño de una investigación epidemiológica de la candidiasis oral en pacientes infectados por el VIH y pacientes en fase sida, en la década de 1990. El nombre propuesto para esta nueva especie fue *C. dubliniensis* debido a Dublín, la capital de la República de Irlanda, donde la nueva especie fue identificada por primera vez (1).

Desde el primer caso descubierto en Dublín, *C. dubliniensis* se ha aislado e identificado en muchas regiones del mundo: Marruecos, Sur África, Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, USA, Venezuela, China, India, Japón, Malasia, Bélgica, Inglaterra, Francia, Alemania, Islandia, Italia, Eslovaquia, España, Irán, Israel, Kuwait, Arabia Saudita, Tunisia y Turquía (2).

A pesar de que *C. dubliniensis* se recuperó inicialmente de la cavidad oral, varios estudios informan del hallazgo de esta especie en otras partes del cuerpo, incluyendo el

tracto respiratorio, sangre, sistema nervioso central, vagina, orina, piel y heces, tanto en pacientes VIH-positivos como en pacientes VIH-negativos (2-4).

El primer aislamiento de *Candida dubliniensis* reportado en Venezuela fue en el año 2002 (5), en donde se aislaron 16 cepas identificadas primero por métodos fenotípicos (CHROMagar *Candida*, test de termotolerancia y el agar Staib) y luego se corroboró la especie mediante el uso de la biología molecular (RAPD) (6). Posteriormente en el 2003 se identificaron otras tres *Candida dubliniensis*, mediante el uso de ensayos de PCR con cebadores especie-específico (7, 8).

C. albicans y *C. dubliniensis* presentan una estrecha relación filogenética. Ambas especies poseen la capacidad de adherirse a las superficies epiteliales, de secretar proteinasas, de producir tubos germinales y clamidocidias. La similitud de estas especies puede traer como consecuencia que en un laboratorio microbiológico se identifique en forma errónea *C. dubliniensis* como *C. albicans* y viceversa (9). A pesar de esta semejanza, estas especies muestran diferencias en los nive-

les de resistencia a los antifúngicos y en la capacidad de causar infecciones. *C. dubliniensis* ha ganado importancia como patógeno oportunista y debido a su predisposición para generar rápidamente resistencia al flucanazol, se ha convertido en una especie que debe de ser identificada adecuadamente en las muestras clínicas (10).

Las pruebas más precisas para diferenciar estas especies son las técnicas de biología molecular, como son la electroforesis en campo pulsado y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (9). Sin embargo, estas técnicas sofisticadas son costosas y laboriosas, por lo cual resultan poco prácticas para la mayoría de los laboratorios de micología clínica del país; en tal sentido, se justifica la búsqueda de métodos fenotípicos, económicos y lo más precisos posibles (11).

Existen diversos métodos fenotípicos de reciente uso, para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, asequibles a cualquier laboratorio clínico, los cuales están basados en la incapacidad de *C. dubliniensis* de crecer en agar Sabouraud dextrosa a 45°C (12) y en agar Sabouraud hipersalado (NaCl al 6.5%) (13), la ausencia de actividad lipolítica en el agar Tween 80 (4, 14), la capacidad de formar clamidoconidias en diversos medios de cultivos como el agar tabaco (15-17), el agar Pal's (18) y el agar tomate-zanahoria (4), así como las pruebas de aglutinación con partículas de látex específicas para *C. dubliniensis* (19, 20).

Por todo lo antes expuesto el propósito de este trabajo es determinar cuál o cuáles de los métodos fenotípicos reportados actualmente en la literatura para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* es el más fiable, menos laborioso y más asequible para los laboratorios clínicos del país.

Materiales y métodos

Se utilizaron 6 cepas de *Candida dubliniensis* provenientes de centros de colección de levaduras: S2-6, S-636, S-645, S2-14 y S2-5 del Health Science Center University of Texas USA y *C. dubliniensis* CD36 (NCPF 3949) de la National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF, Bristol, United Kingdom), esta última suministrada por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). También se utilizó un control de *C. albicans* (ATCC 90028) de la American Type Culture Collection. Cada una de estas cepas fueron sometidas a los métodos fenotípicos: agar Sabouraud dextrosa a 45°C (12), agar Sabouraud con NaCl al 6,5% (13), agar Tween 80 (14), agar tabaco (15), agar Pal's (18), agar tomate-zanahoria (4) y a la prueba de aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®) (19) para su estandarización en el laboratorio. Los ensayos se realizaron utilizando el método de doble ciego con el objetivo de disminuir en lo posible el sesgo del observador y se llevaron a cabo por triplicado para evaluar su reproducibilidad.

También se recolectaron 70 aislados identificados fenotípicamente como *Candida albicans* por el medio de CHROMagar *Candida* y el medio de Bilis agar Feo, procedentes de distintas muestras clínicas como: (3) heces, (15) paladar, (16) prótesis dentales removibles, (1) cepillo de dientes, (2) sangre, (31) flujo vaginal y (2) orina, suministradas por diferentes Hospitales del área metropolitana de Caracas (Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo" y Hospital Universitario de Caracas) y de la Sección de Micología Médica "Dr. Dante Borelli" del Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Con los 70 aislados se evaluaron los métodos fenotípicos antes mencio-

nados ya estandarizados, para determinar cuáles eran los más efectivos en diferenciar *Candida dubliniensis* de *Candida albicans*. En cada ensayo se utilizó una cepa control de *C. dubliniensis* (S2-6) y un control de *C. albicans* (ATCC 90028).

La aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®) empleada en este estudio, se consideró como método de referencia debido a que esta prueba ostenta un 97,1 % de sensibilidad y 100% de especificidad (19). Es por ello que una vez evaluados los 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* con todos los métodos fenotípicos ya estandarizados en el laboratorio, se procedió a comparar cada procedimiento con la técnica de aglutinación, a fin de determinar los falsos positivos arrojados por cada uno de los mismos, estableciendo así cuáles métodos son los más confiables al momento de diferenciar dichas especies. Cabe destacar además que el método estadístico empleado en este trabajo fue el análisis porcentual (%) de las variables estudiadas.

En la Tabla 1 se señalan las características macroscópicas y microscópicas correspondientes a cada especie, que se obtienen con los diferentes métodos evaluados en este estudio (4, 12-15, 18, 19).

Resultados

Los resultados, referentes a los aspectos macroscópicos y microscópicos de las diferentes pruebas utilizadas en los controles, están consignados en la Tabla 2 (Figuras 1-4).

Con respecto a los 70 aislados identificados previamente como posibles *C. albicans*, al ser evaluados con los diferentes métodos fenotípicos, encontramos que al estudiar la temperatura de crecimiento en agar Sabouraud dextrosa a 45°C se observó que 11 (16%) de los 70 aislados tuvieron un crecimiento débil (+/-) o no crecieron (-) En cuanto al agar Sabouraud hipersalado (NaCl al 6,5%) se obtuvo que 15 (21%) exhibieron un crecimiento pobre (+/-) o no crecimiento (-) en este medio. Cuando se observó el com-

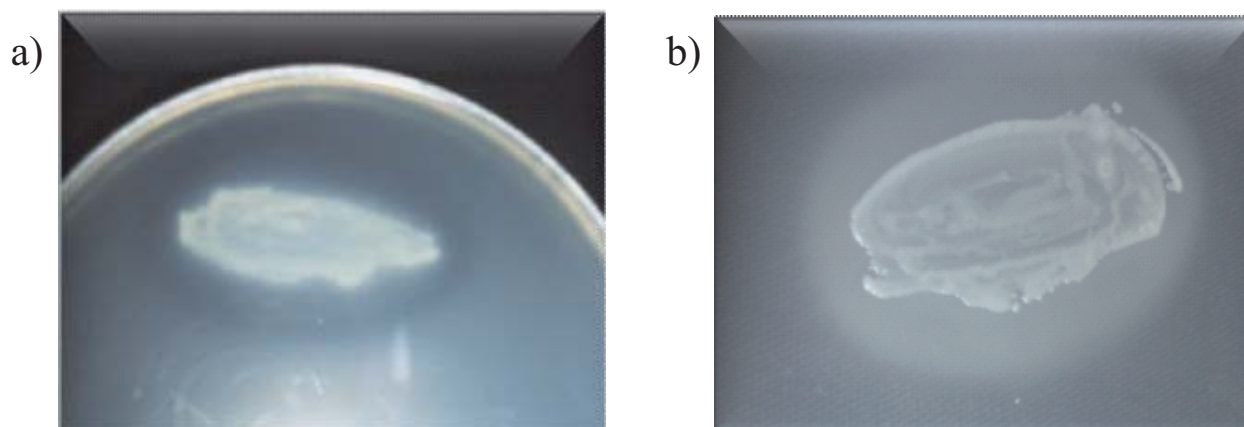
Tabla 1. Características fenotípicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* que se observan con los distintos métodos ensayados.

Método	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Agar Sabouraud dextrosa a 45°C	Crecimiento.	Escaso o no crecimiento.
Agar Sabouraud con NaCl al 6,5%	Crecimiento.	Escaso o no crecimiento.
Agar Tween 80	Presencia de halo opaco alrededor de la colonia.	Ausencia de halo opaco.
Agar tabaco	Colonia blanca, lisa. Ausencia de clamidoconidias.	Colonia dorada, rugosa con franja de hifas. Clamidoconidias abundante
Agar Pal's	Colonia gris y cremosa Ausencia de clamidoconidias.	Colonia gris, rugosa y con franja de hifas. Clamidoconidias abundantes.
Agar tomate-zanahoria	No produce clamidoconidias.	Produce abundantes clamidoconidias.
Aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®)	No aglutinación.	Aglutinación.

Tabla 2. Características fenotípicas correspondientes a los controles de *C. albicans* y *C. dubliniensis* evaluados con los distintos métodos ensayados.

Aislado	45°C	NaCl 6,5%	T80	Agar tabaco	Agar Pal's	Agar tomate- zanahoria	ACPL
<i>C. albicans</i>	+	+	+	Blanco, liso, brillante	Liso, borde regular	Cl –	-
ATCC	+	+	+	Cl -	Cl -	Hifas –	
90028	+	+	+	H –	H -		
S2-6	-	-	-	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	-	-	-	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	-	-	-	H +	H +		
S-636	-	-	-	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	-	-	-	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	-	-	-	H +	H +		
S-645	-	-	-	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	-	-	-	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	-	-	-	H +	H +		
S2-14	+/-	+/-	+	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	+/-	+/-	++	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	+/-	+/-		H +	H +		
S2-5	-	-	-	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	-	-	-	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	-	-	-	H +	H +		
NCPF 3949	-	-	-	Dorado, rugoso, opaco	Rugoso, borde filamentosos	Cl + abtes	+
	-	-	-	Cl + abtes.	Cl + abtes.	H +	
	-	-	-	H +	H +		

T80: Tween 80. Cl: Clamidoconidias. H: Hifas. 45°C: (+) crecimiento (-) sin crecimiento (+/-) débil crecimiento.
 T80: (+) halo de opacidad (-) sin halo de opacidad. Aglutinación con partículas de látex: (+) *C. dubliniensis*.
 ACPL: Aglutinación con partículas de látex.

**Figura 1.** a) Colonia de *C. dubliniensis* en agar Tween 80. b) Colonia de *C. albicans* en agar Tween 80.

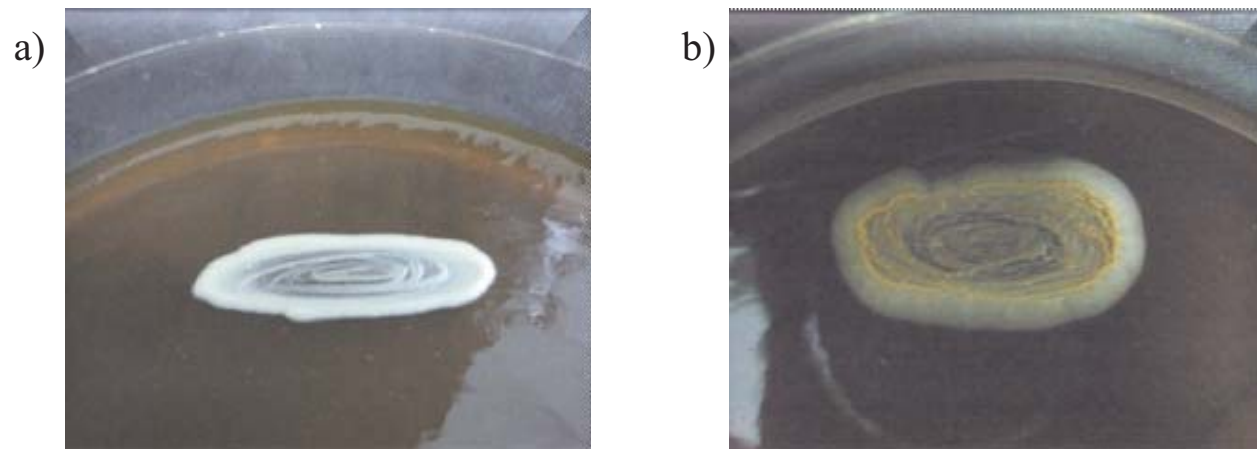


Figura 2. a) Colonia de *C. albicans* en agar tabaco. b) Colonia de *C. dubliniensis* en agar tabaco. Técnica descrita por Khan ZU (15).

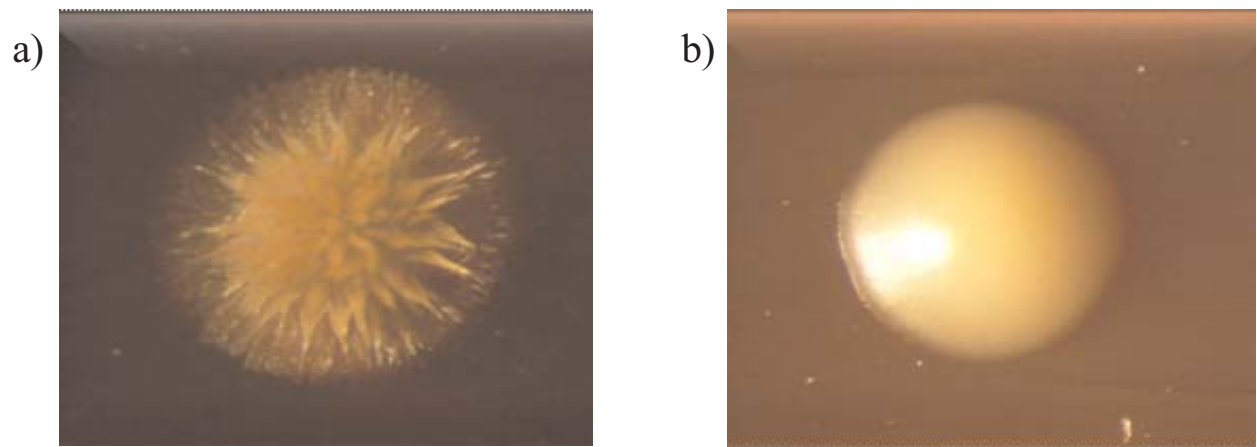


Figura 3. a) Colonia de *C. dubliniensis* en agar tabaco. b) Colonia de *C. albicans* en agar tabaco.

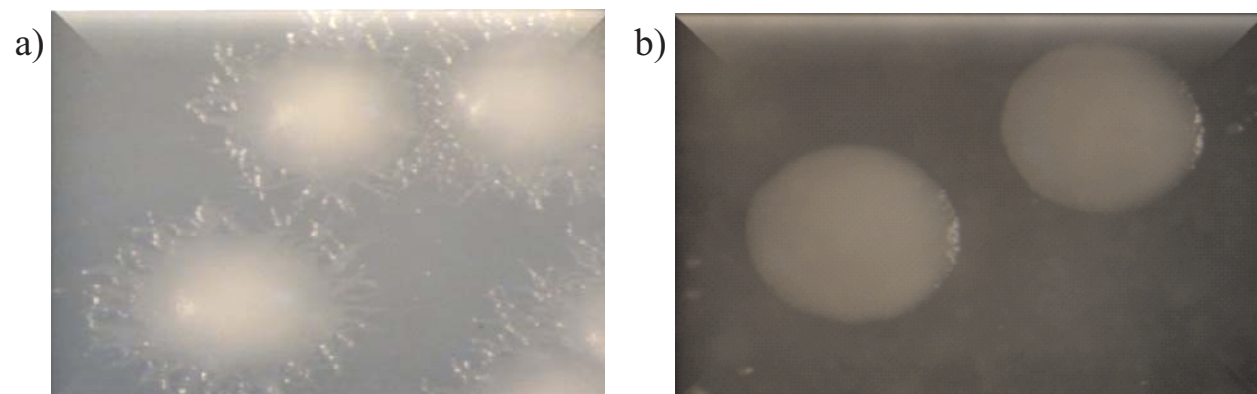


Figura 4. a) Colonias de *C. dubliniensis* en agar Pal's. b) Colonias de *C. albicans* en agar Pal's.

portamiento de las mismas en el medio de Tween 80 se encontró que 13 (19%) de los 70 aislados no produjeron halo de opacidad.

Los resultados obtenidos con el agar tabaco y el agar Pal's en los 70 aislados, se describen en la Tabla 3 y 4 respectivamente.

Al observar microscópicamente las cepas en el medio de tomate-zanahoria se observó que 8 (11,4%) de los 70 aislados desarrollaron clamidoconidias. En la prueba de aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®), sólo 1 (1,4%) de los 70 aislados produjo aglutinación.

Se consideró la prueba de aglutinación con partículas de látex como un método de

referencia para la distinción entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* a nivel fenotípico, debido a su alta especificidad (100%) y alta sensibilidad (97,1%), por lo tanto se comparó cada método utilizado con la técnica de aglutinación (Tabla 5).

Discusión y conclusiones

Se han reportado diversos métodos fenotípicos para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* (2), asequibles a cualquier laboratorio clínico, los cuales están siendo utilizados recientemente en múltiples laboratorios a nivel mundial, con la esperanza de realizar

Tabla 3. Características fenotípicas macro y microscópicas de los 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* en el medio de agar tabaco.

Características macroscópicas		Clamidoconidias	N° de cepas	%	
Color	Aspecto				
Blanco	Liso y brillante	-	4	5,7	
Beige	Liso y brillante	Escasas	15	21,4	
Beige	Liso y brillante	-	37	52,9	
Beige	Rugoso y brillante	Escasas	2	2,9	
Dorado	Liso y brillante	Escasas	3	4,2	
Dorado	Liso y brillante	-	2	2,9	
Dorado	Rugoso y opaco	Abundantes	7	10	
Total		27	43	70	100

(-) Ausencia de clamidoconidias.

Tabla 4. Características fenotípicas macro y microscópicas de las 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* en el medio de agar Pal's.

Características macroscópicas	Clamidoconidias	N° de cepas	%	
Liso y borde regular	Escasas			7
Liso y borde regular	-	52	74,3	
Liso y borde filamentoso	Escasas	1	1,4	
Liso y borde filamentoso	-	4	5,7	
Rugoso y borde filamentoso	Abundantes	6	8,6	
Total	14	56	70	100

(-) Ausencia de clamidoconidias.

Tabla 5. Falsos positivos arrojados por los métodos fenotípicos ensayados, tomando como método de referencia la aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®).

Método	N° de cepas sospechosas de ser <i>C. dubliniensis</i> en este medio	N° de cepas identificadas como posibles <i>C. dubliniensis</i> con la técnica de aglutinación	% Falsos positivos
45°C	11	1	$10/11 \times 100 = 90,9\%$
NaCl 6,5%	15	1	$14/15 \times 100 = 93.3\%$
Tween 80	13	0*	$13/13 \times 100 = 100\%$
Agar tabaco	7	1	$6/7 \times 100 = 85.7\%$
Agar Pal's	6	1	$5/6 \times 100 = 83.3\%$
Agar tomate-zanahoria	4	1	$3/4 \times 100 = 75\%$

* El aislado que resultó positivo en el test de aglutinación con partículas de látex, no está contenido en las 13 cepas mencionadas ya que sí produjo halo de opacidad.

una identificación de especie más efectiva sin necesidad de utilizar la genotipificación que es muy costosa y laboriosa.

En este sentido, la mayoría de las técnicas evaluadas en este trabajo dieron los resultados descritos en la literatura universal, desde el punto de vista de las características fenotípicas macroscópicas y microscópicas (4, 12-15, 18, 19), tanto para la cepa de *C. albicans* como para las 6 cepas de *C. dubliniensis* utilizadas como controles. Al evaluar los 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* se observaron discrepancias con algunos de los métodos ensayados que valdría la pena discutir

Al emplear el test de termotolerancia a 45°C se determinó que 11 (16%) de los 70 aislados identificados como posibles *C. albicans* no crecieron en agar Sabouraud dextrosa a 45°C. Estas cifras son similares a las reportadas por Gales y cols. en 1999 (21), quienes encontraron que un 23% de las *C. albicans* estudiadas, no crecieron a esta temperatura. En otros estudios como el de Kirkpatrick y cols. en 1998 (22), encontraron un 64% y Fotedar y cols. en 2003 (3), un 62.8% de ausencia de crecimiento de esta especie. Es por ello que

algunos investigadores consideran este método poco específico (3, 21-22); sin embargo, el mismo puede ser usado como tamizaje en la detección de *C. dubliniensis* debido a lo económico y sencillo de preparar, tal como lo afirman Pinjon y cols. en el año 1998 (12).

Con respecto al medio de agar Sabouraud hipersalado se encontró que 15 (21%) de los 70 aislados evaluados no crecieron. Sin embargo, Akgul y cols. en 2009 (13), encontraron que el medio hipersalado es 100% específico para demostrar la presencia de *C. dubliniensis*, por lo tanto, recomiendan su uso en un laboratorio clínico de micología de manera rutinaria. No obstante, consideramos a nuestro parecer que el agar Sabouraud hipersalado no debe emplearse como medio referencial para la identificación de ambas especies de *Candida* sino como tamizaje. No se encontró otro estudio para realizar una comparación más precisa.

El método más controversial fue el medio de agar Tween 80, el cual mostró una gran variabilidad en lo que respecta a los resultados obtenidos. En este sentido, se encontró que 1 (16,7%) de las 6 cepas control de *C. dubliniensis* presentó actividad lipolítica.

Sin embargo, estudios publicados recientemente destacan que *C. dubliniensis* puede presentar actividad lipolítica, tal y como lo demostraron Kumar y cols. en 2006 (23), quienes demostraron que el 15% de las *C. dubliniensis* utilizadas en su estudio tenían esta actividad. Asimismo, Pineda y cols. en 2008 (4), hallaron resultados muy similares a los reportados en este estudio, ya que en el caso de estos autores, fue de 16,6%.

Por otro lado, en los 70 aislados se observó que 13 (19%) de los mismos no mostraron actividad lipolítica y 57 (81%) si desarrollaron esta actividad; contrario a lo reportado por Slifkin en el 2000 (14), quien señala que el 100% de las cepas de *C. albicans* evaluadas con este medio mostraron actividad lipolítica y el 100% de las *C. dubliniensis* no desarrollaron actividad en el mismo, razón por la cual lo recomienda como un medio excelente para la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. No obstante, fue considerado el menos confiable de todas las técnicas evaluadas en este estudio, tal como lo refieren Kumar y cols. en 2006 (16), Pineda y cols. en 2008 (4) y Akgul y cols. en 2009 (13).

En relación al medio de agar tabaco se determinó que es un medio bastante confiable, ya que permite hacer diferencias de los aislados tanto a nivel macroscópico como microscópico. En este sentido, se observaron diferencias en el color de las colonias analizadas, por lo que estas fueron agrupadas en colonias blancas, beige y doradas. También hubo diferencias en cuanto al aspecto de las mismas, lo cual nos permitió dividir las en las que poseían un aspecto liso-brillante, rugoso-brillante o rugoso-opaco. A la luz de nuestros conocimientos, no se encontró ningún estudio que haya reportado estas características. Los resultados de este trabajo reflejaron que en 4 (5,7%) de los 70 aislados, las co-

lonias fueron blancas y lisas. Pineda y cols. (4) reportaron 98,5% de cepas de *C. albicans* con estas características y Khan y cols. (15) un 100%. También se observó que las colonias blancas no desarrollaron clamidoconidias al igual que los trabajos antes referidos. Cincuenta y cuatro colonias (77,2%) fueron de color beige, con un aspecto liso-brillante o rugoso-brillante y desarrollaron escasas clamidoconidias, por lo cual no cumplen con los requisitos macro y microscópicos para definir las como *C. dubliniensis* en este medio. 7 (10%) de los 70 aislados estudiados, formaron colonias de color dorado, aspecto rugoso y opaco, con abundantes clamidoconidias; características similares a las observadas en las 6 cepas control de *C. dubliniensis*.

Por todo lo anteriormente expuesto se puede establecer que los aislados que produjeron colonias blancas tienen una elevada probabilidad de ser *C. albicans* y que los aislados que produjeron colonias doradas, rugosas y opacas con abundantes clamidoconidias, *C. dubliniensis*. La única desventaja que se encontró en este medio fue en relación con la formación de colonias de color beige y su correcta identificación, ya que el personal no experimentado podría plantearse una confusión al momento de interpretar los resultados, aun cuando la observación en el microscopio solventaría esta duda, porque las clamidoconidias serían escasas o nulas. Nosotros pensamos que es una técnica confiable y la recomendamos para la diferenciación de estas dos especies.

En relación con el agar Pal's se observó a nivel macroscópico cuales colonias eran lisas o rugosas. El 100% de las cepas de control de *C. dubliniensis* formaron colonias rugosas con borde filamentosos y a nivel microscópico se evidenció la presencia de abundantes clamidoconidias. Al Mosaid y cols. en 2003 (18),

reportaron con este medio un 93,75% de *C. dubliniensis* productoras de clamidoconidias.

En cuanto a los 70 aislados sugestivos de *C. albicans*, 64 (91,4%) de estos produjeron colonias lisas, de borde regular o borde filamentoso, que desarrollaron escasas o ninguna clamidoconidia. Al Mosaid y cols. (18) en su estudio determinaron que ninguna cepa de *C. albicans* produjo clamidoconidias. En este trabajo, 6 (8,6%) aislados formaron clamidoconidias abundantes, los cuales provenían de colonias de aspecto rugoso y borde filamentoso, al igual que lo obtenido en los controles de *C. dubliniensis*, siendo la mayoría de los aislados con estas características compatibles con las cepas que formaron colonias doradas, rugosas y opacas con abundantes clamidoconidias en el medio de agar tabaco.

Con respecto al agar tomate-zanahoria, todas las cepas de *C. dubliniensis* produjeron abundantes clamidoconidias, así como 4 (5,7%) de los 70 aislados evaluados. A pesar de que este medio a nuestro parecer resultó ser bastante específico para la discriminación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, por lo que se recomienda ampliamente, tiene la desventaja de ser muy laborioso en su preparación.

Al realizarle a los 70 aislados el test de aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®), el cual posee una sensibilidad de 97,1% y una especificidad de 100%, se obtuvo que 1 (1,4%) aislado produjo una reacción positiva, mientras que en el resto (98,6%) no hubo aglutinación.

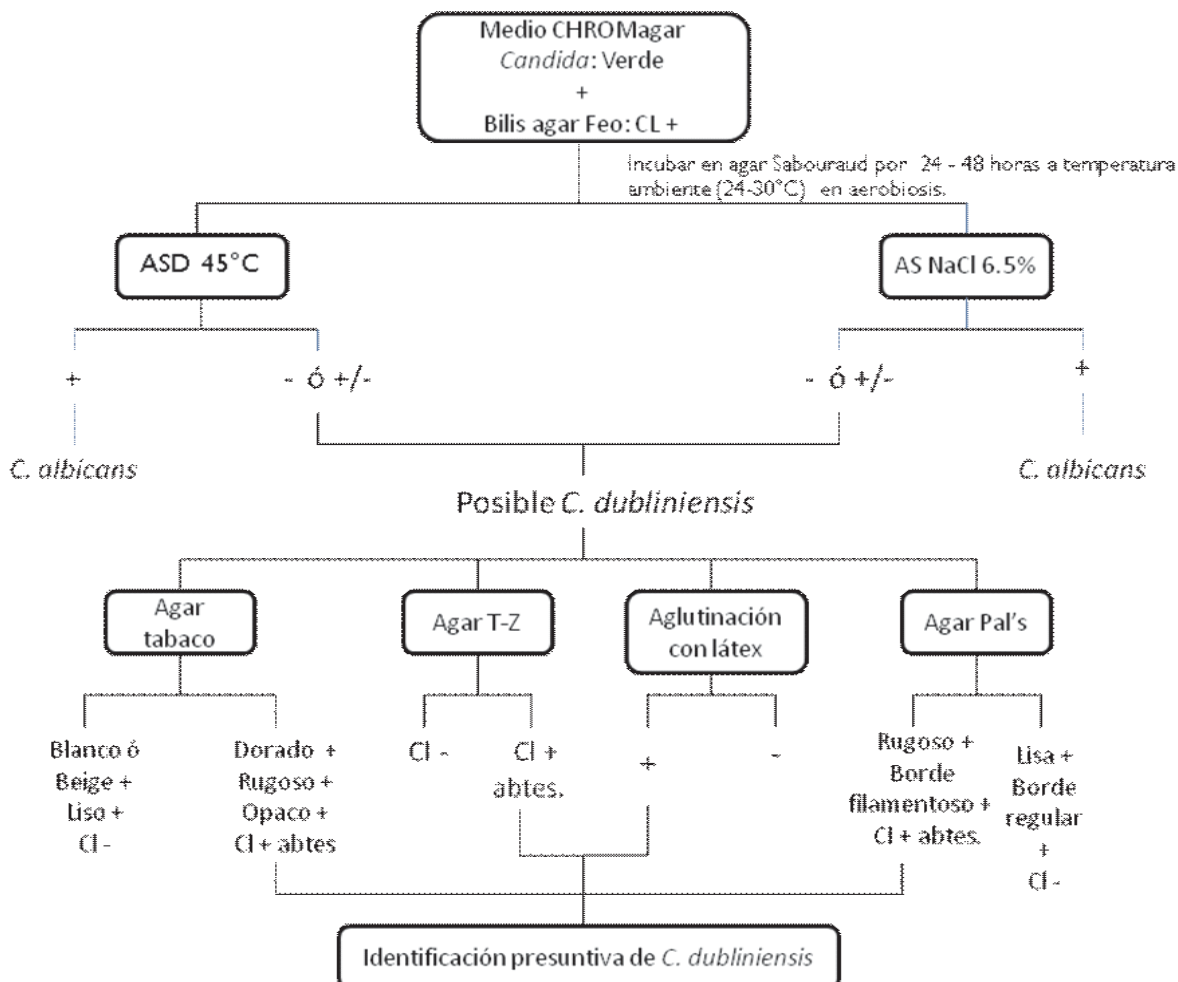
Al comparar la técnica de aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®) con los 6 métodos restantes: test de termotolerancia a 45°C, agar Sabouraud hi-

persalado, agar Tween 80, agar tabaco, agar Pal's y agar tomate-zanahoria, se encontró que el medio de agar tomate-zanahoria fue el método con menor porcentaje de falsos positivos (75%), seguido del medio agar Pal's (83,3%) y el medio de agar tabaco (85,7%). La prueba de termotolerancia a 45°C y el agar Sabouraud hipersalado presentaron 90,9 y 93,3% respectivamente. Con el agar Tween 80 obtuvimos 100% de falsos positivos.

Por estos hallazgos se recomienda como métodos de diferenciación fenotípica entre estas dos especies el medio de agar tomate-zanahoria, el agar Pal's, el agar tabaco y principalmente la aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®). El agar Sabouraud dextrosa a 45°C y el agar Sabouraud hipersalado como son medios tan fáciles de preparar y de interpretar podrían ser empleados como métodos de tamizaje, tal como lo sugieren diversos autores (3, 12, 21).

Es importante destacar que el uso de un solo método no garantiza resultados confiables, deben utilizarse un mínimo de 4 métodos para la diferenciación fenotípica de dichas especies, por lo que recomendamos: el agar Sabouraud dextrosa a 45°C, el medio agar Pal's, el agar tabaco y la aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®). También se recomienda el medio de agar tomate zanahoria para la diferenciación fenotípica entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, a pesar de lo laborioso de su preparación.

Finalmente, se puede afirmar en base a los resultados obtenidos en este trabajo, que el uso de estos métodos en la práctica diaria permitirían una diferenciación fenotípica aceptable entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. En nuestra experiencia recomendamos el siguiente esquema para la discriminación de estas dos especies (Anexo 1).



Anexo 1 .Esquema de identificación fenotípica de *Candida dubliniensis* empleado en el presente estudio.

Referencias bibliográficas

- (1) Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995; 141:1507-1521.
- (2) Loreto E, Scheid L, Nogueira C, Zeni G, Santurio J, Alves S. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*. 2010; 169:431-443.
- (3) Fotedar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a University in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1907-1911.
- (4) Pineda G, Arechavala A, Scollo K, Santiso G, Lehmann E. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2008; 40: 211-217.
- (5) Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Sánchez L, Gallardo S, Pérez C, Colella MT, y cols. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en Venezuela. *Antibiot Infec* 2002; 40:165-170.
- (6) Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Pérez C, Colella MT, Roselló A, Olaizola C. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia*. 2005; 160:227-234.
- (7) Gamboa A, Mendoza M, Fernández A, Díaz E. Detection of *Candida dubliniensis* in pa-

- tients with candidiasis in Caracas, Venezuela. *Rev. Iberoam Micol.* 2006; 23: 81-84.
- (8) Mendoza M, Brito A, Díaz E, Ramos R. Especies de *Candida* en cavidad oral de niños desnutridos: A propósito de un caso con *Candida dubliniensis*. *Kasmera.* 2006; 34 (2): 119-122.
- (9) Mesa L, Arcaya N, Cañas O, Machado Y, Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam Micol.* 2004; 21: 135-138.
- (10) Paugam A, Baixench MT, Viguié C. Actualités sur *Candida dubliniensis*. *Médecine et maladies infectieuses.* 2008; 38:1-7.
- (11) Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (2): 329-334.
- (12) Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin. Microbiol. Microbiol.* 1998; 36(7): 2093-2095.
- (13) Akgül O, Çerikçioğlu N. Hypertonic Sabouraud dextrose agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*. *Mycopathologia.* 2009; 167:357-359.
- (14) Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:4626-4628.
- (15) 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(10): 4796-4798.
- (16) Kumar CPG, Menon T. Evaluation of tobacco agar for chlamydosporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Med Mycol.* 2006; 16:58.
- (17) Anane S, Kallel K, Kaouech E, BelHaj S, Chaker E. *Candida dubliniensis*: a novel emerging specie. *Ann Biol Clin.* 2007; 65 (1): 13-19.
- (18) Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4787-9.
- (19) Sahand IH, Moragues MD, Robert R, Quindos G, Ponton J. Evaluation of Bichro-Dubli-Fumouze® to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 55:165-167.
- (20) 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; 44:138-142.
- (21) Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and methyl- α -D-glucoside as determined with eht API 20C AUX and Vitek TBC Systems. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3804-3808.
- (22) Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3007-3012.
- (23) Kumar C.P.G, Menon T, Sundararayan T, Nalini S, Thirunarayan M.A, Rajasekaran S, Venkatesikalum M. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Rev Iberoam Micol.* 2006; 23: 101-103.