



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PERFIL DE
SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* Y *Candida dubliniensis*
AISLADAS DE PACIENTES AMBULATORIOS Y HOSPITALIZADOS**

CAROLINA PAOLA DURÉ PAREDES

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PERFIL DE
SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* Y *Candida dubliniensis*
AISLADAS DE PACIENTES AMBULATORIOS Y HOSPITALIZADOS**

CAROLINA PAOLA DURÉ PAREDES

Tutora: DRA. MARGARITA SAMUDIO ACEVEDO

Co-tutora: DRA. NORMA JOVITA FARIÑA GONZÁLEZ

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Duré Paredes, Carolina Paola

Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados / Carolina Paola Duré Paredes; Tutora: Margarita Samudio Acevedo; Co-tutora: Norma Jovita Fariña González.- -San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas; 2021.

xxi, 80; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. *Candida albicans* 2. *Candida dubliniensis* 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa 4. Pruebas de Sensibilidad Microbiana 5. Antifúngicos I. Título

CDD: (ed. 18^a) 616.969
D933d



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEP”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA DRA. MARGARITA SAMUDIO ACEVEDO, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Carolina Paola Duré Paredes** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 20 días del mes de mayo de 2021.

Tutora: Dra. Margarita Samudio Acevedo, PhD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA DRA. NORMA JOVITA FARIÑA GONZÁLEZ, DOCENTE
INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE
LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Carolina Paola Duré Paredes** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 20 días del mes de mayo de 2021.

Co-tutora: Dra. Norma Jovita Fariña González, MSc.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA
UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Carolina Paola Duré Paredes** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **Dra. Margarita Samudio Acevedo** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 15 días del mes de junio de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica
de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes
ambulatorios y hospitalizados**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Carolina Paola Duré Paredes

Aprobado el 21 de junio de 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dra. Juana Ortellado de Canese, MSc., Hospital de Clínicas, San
Lorenzo, Paraguay

Prof. Dra. Florencia del Puerto Rodas, PhD., Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay

Dra. Martha Marín Ricart, MSc., Hospital Nacional de Itauguá, Itauguá,
Paraguay,

BC. Patricia Araújo López, MSc., Laboratorio Central de Salud Pública,
Asunción, Paraguay

Dra. Margarita Samudio Acevedo
Tutora

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA
 SALUD
 UNIDAD DE DOCENCIA
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
 Campus de la UNA, San Lorenzo – Paraguay
 postgrado@iics.una.py
 Teléfono: 595 021 326 5411



ACTA DE EVALUACIÓN

EVALUACIÓN DE	DEFENSA PÚBLICA DE TESIS
NÚMERO DE CREDITOS	S/N
PROGRAMA	Maestría en Ciencias Biomédicas

TÍTULO DE TESIS	Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados
-----------------	--

APELLIDO Y NOMBRE	CALIFICACIÓN	
	NÚMERO	LETRAS
DURÉ PAREDES, CAROLINA PAOLA	5	Cinco

ACTA: MCB-085	FECHA: 21 de junio del 2021
---------------	-----------------------------

PRESIDENTE	
Prof. Dra. Juana Medarda Ortellado de Canese, MSc.	
MIEMBROS	
B.C. Patricia Violera Araújo López, MSc.	
Dra. Ramona Florencia Del Puerto Rodas, PhD	
Dra. Martha Marín Ricart, MSc.	

OBSERVACIÓN:

DEDICATORIA

A mi familia, Virginia y Osvaldo

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Margarita Samudio, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación e incentivarme a realizar esta Maestría.

A mi co- tutora Norma Fariña, por el apoyo continuo durante todo este periodo y los valiosos aportes realizados.

Al Departamento de Microbiología del Instituto de investigaciones en Ciencias de la Salud.

Al CONACYT, por financiar este programa de Maestría en Ciencias Biomédicas.

A la Dra. Alicia Pereira del Laboratorio San Roque, por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Heriberto Núñez, por su valiosa colaboración en la recolección de muestras odontológicas.

A todos mis compañeros de trabajo, quienes me ayudaron a llegar a la meta, en especial a Sonia Abente, Antonia Ruíz y Evelyn López.

DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* Y *Candida dubliniensis* AISLADAS DE PACIENTES AMBULATORIOS Y HOSPITALIZADOS

Carolina Paola Duré Paredes*, Margarita Samudio Acevedo**, Norma Fariña González**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Docente Investigador, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

Las levaduras del complejo *Candida albicans* son prevalentes en infecciones oportunistas. *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* son especies estrechamente relacionadas y su diferenciación fenotípica se dificulta por métodos convencionales. Objetivo: Diferenciar fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados de diferentes servicios de salud de Asunción, Paraguay. Metodología: Se incluyeron levaduras aisladas de materiales respiratorios, cavidad bucal, orina, sangre y secreciones varias. Los aislamientos subcultivados en agar Sabouraud y agar Cromogénico Candida (CONDA® pronadisa, España), fueron incubados a 35 °C durante 48 h; las colonias de color verde en el medio cromogénico, presuntivo de las especies *C. albicans*/*C. dubliniensis* fueron sometidas a la PCR dúplex, utilizando cebadores específicos CAL y CDU. El ADN se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA (PROMEGA) con algunas modificaciones. La sensibilidad a fluconazol, voriconazol, anfotericina B, flucitosina, caspofungina y micafungina se determinó por VITEK® 2 a un subgrupo de aislamientos. Resultados: La PCR dúplex se estandarizó con éxito siendo el límite de detección de $10 \cdot 10^{-4}$ ng/μL. De 1090 aislamientos, 846 (77,6 %) fueron *C. albicans* y 2 (0,2 %) *C. dubliniensis*, estos últimos aislados provenientes de cavidad bucal, uno de un paciente inmunocompetente y otro de inmunocomprometido; los 242 restantes fueron negativos para ambas especies. El 95,6 % de 512 aislamientos de *C. albicans* fueron sensibles a fluconazol, 91,2 % a voriconazol, 99,0 % a anfotericina B, 96,9 % a flucitosina, 100 % a caspofungina y micafungina. Las dos cepas de *C. dubliniensis* presentaron CIM de $\leq 0,5$ μg/mL a fluconazol, $\leq 0,12$ μg/mL a voriconazol y $\leq 0,25$ μg/mL a anfotericina B. Conclusión: La frecuencia de *C. dubliniensis* es baja con relación a otros estudios que informan 1,5 a 32 %. *C. albicans* mostró alta sensibilidad a los antifúngicos. No se obtuvo indicios de resistencia en las dos cepas de *C. dubliniensis*.

Palabras claves: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Pruebas de Sensibilidad Microbiana, Antifúngicos.

PHENOTYPIC, MOLECULAR DIFFERENTIATION AND ANTIFUNGAL SENSITIVITY PROFILE OF *Candida albicans* AND *Candida dubliniensis* ISOLATED FROM AMBULATORY AND HOSPITALIZED PATIENTS

Carolina Paola Duré Paredes*, Margarita Samudio Acevedo**, Norma Fariña González**

* Student of the Master's Degree in Biomedical Sciences, Health Sciences Research Institute, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción

** Research Professor, Health Sciences Research Institute, National University of Asunción

ABSTRACT

Candida albicans complex are prevalent in opportunistic infections. *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* are closely related species and their phenotypic differentiation is made difficult by conventional methods. Objective: To differentiate the phenotypic, molecular and antifungal sensitivity profile of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from outpatients and hospitalized patients from different health services in Asunción, Paraguay. Methodology: Yeasts isolated from respiratory materials, oral cavity, urine, blood and various secretions were included. The isolates subcultured on Sabouraud agar and Chromogenic Candida agar (CONDA® pronadisa, España) were incubated at 35 ° C for 48 h; the green colonies in the chromogenic medium, presumptive of the species *C. albicans*/ *C. dubliniensis* were subjected to duplex-PCR, using specific CAL and CDU primers. DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA kit (PROMEGA) with some modifications. Sensitivity to fluconazole, voriconazole, amphotericin B, flucytosine, caspofungin, and micafungin was determined by VITEK® 2 in a subset of isolates. Results: The duplex-PCR was successfully standardized; the detection limit was $10 \cdot 10^{-4}$ ng/μL. Of 1090 isolates, 846 (77,6 %) were *C. albicans* and 2 (0,2 %) were *C. dubliniensis*, the latter were isolated from the oral cavity, one from an immunocompetent patient and the other from an immunocompromised patient; the remaining 242 were negative for both species. 95,6 % of 512 isolates of *C. albicans* were sensitive to fluconazole, 91,2 % to voriconazole, 99,0 % to amphotericin B, 96,9 % to flucytosine, 100 % to caspofungin and micafungin. The two strains of *C. dubliniensis* presented MIC of $\leq 0,5$ μg/mL to fluconazole, $\leq 0,12$ μg/mL to voriconazole and $\leq 0,25$ μg/mL to amphotericin B. Conclusion: The frequency of *C. dubliniensis* is lower than other studies that report 1,5 to 32 %. *C. albicans* showed high sensitivity to antifungals. No evidence of resistance was obtained in the two strains of *C. dubliniensis*.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Polymerase Chain Reaction Microbial, Microbial Sensitivity Tests, Antifungal Agents.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	2
1.2 Taxonomía del género <i>Candida</i>	3
1.2.1 Morfología del género <i>Candida</i>	3
1.2.2 Complejo <i>Candida albicans</i>	4
1.2.2.1 <i>Candida dubliniensis</i>	5
1.2.2.2 <i>Candida africana</i>	5
1.2.3 Especies frecuentes de <i>Candida</i>	5
1.3 Mecanismo de patogenicidad	6
1.3.1 Factores de virulencia de <i>Candida</i>	6
1.4. Candidiasis	7
1.4.1 Candidemia	8
1.4.2 Candidiasis orofaríngea	8
1.4.3 Candidiasis vulvovaginal	8
1.4.4 Factores predisponentes del huésped	9
1.5 Epidemiología	9
1.6 Caracterización Microbiológica del complejo <i>C. albicans</i>	12
1.6.1 Métodos fenotípicos convencionales	12
1.6.2 Métodos comerciales	13
1.7 Caracterización Molecular del complejo <i>C. albicans</i>	14
1.7.1 Diferenciación de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> utilizando secuencias de las regiones ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosómico	15
1.8 Agentes antifúngicos	16
1.8.1 Polienos	17
1.8.1.1 Anfotericina B	17
1.8.2 Azoles	17
1.8.2.1 Fluconazol	17

1.8.2.2 Itraconazol	18
1.8.2.3 Voriconazol	18
1.8.2.4 Posaconazol	18
1.8.3 Equinocandinas	19
1.8.4. Fluorocitosina	19
1.8.5 Mecanismos de resistencia antifúngica	19
1.9. Métodos de determinación de la sensibilidad in vitro	20
1.10 Situación de las candidiasis en Paraguay	21
 CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	 23
2.1 Objetivo General	23
2.2 Objetivos Específicos	23
 CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	 24
3.1 Diseño de estudio y población	24
3.2 Variables	25
3.3 Flujograma de trabajo	26
3.4 Método de Cribado	27
3.4.1 Identificación presuntiva en Agar Cromogénico	27
3.5 Estandarización de la PCR dúplex	27
3.5.1 Identificación molecular por PCR dúplex	28
3.5.2 Límite de detección de la reacción de PCR	30
3.6 Estudio de la susceptibilidad a los antifúngicos	30
3.6.1 Método automatizado VITEK® 2	30
3.6.2 Determinación de la CIM: Método Microdilución	33
3.6.3 Control de calidad para determinación de la Susceptibilidad	33
3.7. Estudio Microbiológico Fenotípico	33
3.7.1. Características Macroscópicas	33
3.7.2 Características Microscópicas	34

3.7.3 Identificación fenotípica por VITEK® 2 (bioMérieux)	35
3.8 Asuntos estadísticos	35
3.9 Asuntos éticos	36
3.10 Control de Calidad	36
 CAPÍTULO 4. RESULTADOS	 38
4.1 Características demográficas de los pacientes	38
4.2. Cribado de las cepas del complejo <i>Candida albicans</i>	39
4.3 Estudio Molecular	41
4.4 Identificación por método VITEK® 2	45
4.5 Perfil de sensibilidad de los aislamientos estudiados	47
4.6 Estudio Fenotípico convencional	49
 CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	 53
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	61
 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 63
8. ANEXOS	72
ANEXO A. Aceptación de Protocolo de Tesis 2019	73
ANEXO B. Conformidad del Departamento Microbiología – IICS.	74
ANEXO C. Aceptación de Protocolo del Proyecto CONACYT PINV15-919	75
ANEXO D. Ficha Clínica del Proyecto CONACYT PINV15-919	76
ANEXO E. Especificaciones del Agar Cromogénico Candida (CONDA® pronadisa, España)	77
ANEXO F. Control de calidad de los medios utilizados	78
ANEXO G. Distribución de CIM de azoles según el origen de los aislamientos de <i>C. albicans</i>	79
ANEXO H. Distribución porcentual de especies según el origen del aislamiento.	80

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cambios morfológicos en <i>C. albicans</i>	4
Figura 2. Esquema de las relaciones entre <i>C. albicans</i> y su hospedador	6
Figura 3. Genes ribosomales y disposición de las secuencias ITS	15
Figura 4. Flujograma de Trabajo.	26
Figura 5. Crecimiento de levaduras en agar cromogénico Candida (CONDA® pronadisa, España)	40
Figura 6. Estandarización de la PCR dúplex.	41
Figura 7. Límite de detección de la PCR dúplex para <i>C. dubliniensis</i> .	42
Figura 8. Límite de detección de la PCR dúplex para <i>C. albicans</i> .	42
Figura 9. Límite de detección de la PCR dúplex para <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i> .	43
Figura 10. PCR dúplex de aislamientos de pacientes	44
Figura 11. Formación de tubo germinativo y clamidosporas en agar leche	49
Figura 12. Crecimiento en agar semilla de girasol	50
Figura 13. Prueba de termotolerancia, crecimiento en medio hipersalino y determinación de la actividad esterasa	51
Figura 14. Desarrollo en agar Tabaco	51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Candida</i>	3
Tabla 2. Características fenotípicas para las especies <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i>	13
Tabla 3. Mecanismo de acción de los antifúngicos	16
Tabla 4. Color de las colonias según la especie presuntiva de <i>Candida</i> aislada en el Agar Cromogénico Candida (CONDA®)	27
Tabla 5. Secuencias de cebadores y tamaño de amplicones específicos para <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	28
Tabla 6. Diluciones de los antifúngicos contenidos en las tarjetas VITEK® 2 AST YSO7	31
Tabla 7. Puntos de corte aprobados por el CLSI documento M60 (2017) para interpretar los estudios de sensibilidad de <i>Candida albicans</i> a azoles y equinocandinas	32
Tabla 8. Punto de corte aprobado por el EUCAST documento E.Def 7.3.1 para interpretar sensibilidad de <i>Candida albicans</i> frente a Anfotericina B	32
Tabla 9. Puntos de corte del CLSI documento M60 (2017) para interpretar los estudios de sensibilidad de <i>Candida albicans</i> a flucitosina	33
Tabla 10. Características demográficas de los pacientes	38
Tabla 11. Origen de los aislamientos de <i>Candida</i> spp.	39
Tabla 12. Desarrollo de tonalidades en agar cromogénico (CONDA®)	40
Tabla 13. Resultado de la PCR dúplex de los aislamientos de pacientes	44
Tabla 14. Resultado de la PCR dúplex según el color desarrollado en medio cromogénico	45
Tabla 15. Identificación de <i>Candida</i> spp. por VITEK® 2, según el color desarrollado en agar cromogénico	45
Tabla 16. Identificación final de todos los aislamientos	46
Tabla 17. Distribución porcentual de especies de <i>Candida</i> spp. según el origen de los aislamientos	47

Tabla 18. Perfil de sensibilidad a los antifúngicos de cepas de <i>C. albicans</i>	48
Tabla 19. Perfil fenotípico de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	52
Tabla 20. Perfil fenotípico de <i>C. albicans</i>	52
Tabla 21. Perfil fenotípico de <i>C. tropicalis</i>	52

ABREVIATURAS

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UCI	Unidad de cuidados intensivos
ACT1	Actina 1
ITS	Espaciador transcrito interno
ADNr	Acido desoxirribonucleótido ribosomal
AGS	Agar sabouraud glucosado
RAPD	Fragmentos polimórficos amplificados al azar
EIA	Enzimoinmuno análisis
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado
SAP	Proteasa aspártica secretada
DAP2	Dipeptidil aminopeptidasa 2
HWP1	Proteína de la pared de la hifa 1
ETS	Secuencias transcritas externas
IGS	Espaciadores intergénicos
SSU	Subunidad ribosomal pequeña
LSU	Subunidad ribosomal grande
LCR	Líquido cefalorraquídeo
SNC	Sistema nervioso central
FDA	Food and Drug Administration
MDR	Resistencia a multidroga
CDR	Región determinante de complementariedad
ERG11	gen codificante para resistencia a ergosterol 11
FKS	Resistencia a equinocandinas
CLSI	Instituto de estándares para el laboratorio clínico
BAL	Lavado bronco alveolar
BHI	Caldo cerebro corazón
RNAse	Ribonucleasa
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
TAE	Tris acetato EDTA
EUCAST	Comité Europeo sobre test de sensibilidad antimicrobiana

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

Candida es un hongo levaduriforme, comensal de la microbiota normal humana del aparato gastrointestinal, vagina, piel y otras mucosas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales o alteraciones de la inmunidad del hospedero, expresa factores de virulencia y se convierte en patógeno causando infecciones oportunistas superficiales y sistémicas, que comprenden candidiasis orofaríngea, ocular, cutánea, genital, esofágica, gastrointestinal, mucocutánea crónica y diseminada, especialmente en pacientes con inmunosupresión (1–4).

Con el avance de los estudios moleculares y filogenéticos se han descrito nuevas especies que anteriormente se identificaban como *C. albicans*, actualmente esta especie forma un complejo de especies junto con *C. dubliniensis* y *C. africana*, denominado Complejo *Candida albicans*, comparten características fenotípicas y se encuentran filogenéticamente relacionadas. Debido a la falta de conocimiento, experiencia, procedimientos estandarizados y por su gran semejanza con *C. albicans*, no se ha podido detectar la presencia de *C. dubliniensis* en infecciones micóticas y conocer la prevalencia real. No hay publicaciones hasta la fecha, de estudios realizados en nuestro país sobre esta especie. En este sentido, la PCR puede contribuir al conocimiento epidemiológico de la frecuencia de infecciones por *C. dubliniensis* y la distribución de ésta en la población, de tal manera que se puedan implementar y aplicar planes terapéuticos adecuados.

Por tal motivo, el objetivo general de esta investigación fue identificar *C. albicans* y *C. dubliniensis*, fenotípica y molecularmente, conocer el perfil de sensibilidad o la concentración inhibitoria mínima (CIM) in vitro de aislamientos provenientes de diferentes orígenes clínicos; con la finalidad de brindar esquemas de caracterización que permitan obtener una identificación rápida de esta especie y el conocimiento de la susceptibilidad o CIM in vitro para la implementación de estrategias terapéuticas adecuadas sobre todo en los pacientes más susceptibles de sufrir infecciones por hongos oportunistas como son los inmunocomprometidos, de esta manera aportar a la vigilancia de cepas emergentes y de la resistencia a antifúngicos.

1.2 Taxonomía del género *Candida*

Se han aplicado 100 sinónimos a *Candida albicans*. Charles-Philippe Robin (1821-1885) lo llamó por primera vez *Oidium albicans* en 1853. Después de más estudios, Zopf en 1890 cambió su nombre a *Monilia albicans*. El nombre actualmente aceptado, *C. albicans*, fue introducido por Berkhout en 1923 (5).

Teniendo en cuenta la reproducción sexual de las levaduras se las incluye en las subdivisiones Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (cuando no se conoce la reproducción sexual). *Candida* pertenece a la división Ascomycota como la mayoría de los hongos patógenos, tanto los levaduriformes como los filamentosos (6). La clasificación taxonómica de *C. albicans* puede observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Candida*

Dominio	Eukarya
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya,
Filo	Ascomycota
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Subclase	Saccharomycetidae
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>

Extraído de Schoch *et al.*, 2020 (7).

1.2.1 Morfología del género *Candida*

En la forma levaduriforme, se presenta como células redondas u ovoides que miden entre 2,0 a 4,0 μm de diámetro, considerablemente mayor que las cocáceas bacterianas. Estas levaduras se reproducen por brotamiento o gemación y en determinadas condiciones producen un pseudomicelio filamentoso (8). No producen pigmentos melánicos, y su forma puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas. Todas las especies patógenas oportunistas de *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con pequeños o grandes cúmulos de levaduras o

blastoconidios (excepto *C. glabrata*). La formación de clamidoconidios se hace a partir del pseudomicelio y solo dos especies lo generan; *C. albicans* con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12 μm de diámetro, y *Candida dubliniensis*, con estructuras múltiples o en racimos del mismo tamaño (9).

La transición dimórfica en hongos se describe como la capacidad de las células para alternar durante su ciclo de crecimiento entre la forma de levadura (blastoconidios) y la forma filamentosa (pseudohifas / micelio o hifas). Numerosos factores nutricionales y ambientales, incluyendo temperatura, aminoácidos, cambios de pH, y suero pueden inducir la transición de levadura también denominada blastospora o blastoconidia, a micelio en *C. albicans* (4,5). En la Figura 1 se observa la transición morfológica reversible que experimenta entre blastoconidio, pseudohifa e hifa verdadera (polimorfismo).

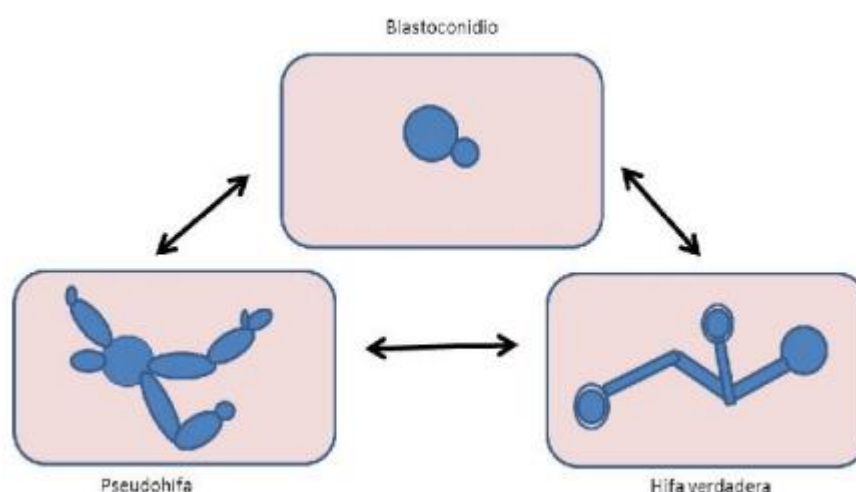


Figura 1. Cambios morfológicos en *C. albicans*. Extraído de Alburquenque *et al.*, 2013 (4).

1.2.2 Complejo *Candida albicans*

El número de especies fúngicas potencialmente patógenas ha sufrido un aumento, siendo muchas de ellas especies crípticas que forman parte de complejos de especies que han sustituido a lo que antes eran consideradas como simples morfoespecies. Ello ha ocurrido en diferentes géneros de mucorales y especialmente de ascomicetes, como es el caso de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* (6). Se han descrito tres

especies que forman parte del complejo *C. albicans*: *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana*, éstas comparten características fenotípicas y están filogenéticamente relacionadas, aunque se encuentra en discusión si *C. africana* es una especie diferente o una variedad de *C. albicans* atípica (10,11).

1.2.2.1 *Candida dubliniensis*

En 1995, Sullivan y colaboradores describieron una nueva especie del género *Candida*, asociada con lesiones orales de pacientes infectados con el VIH, a la que denominaron *Candida dubliniensis* y que se encuentra relacionada filogenéticamente con *Candida albicans* y comparten características fenotípicas, incluyendo la capacidad de producir tubos germinales y clamidoconidias (aunque en mayor cantidad y disposiciones diferentes), lo cual dificulta su identificación en el laboratorio clínico (12).

1.2.2.2 *Candida africana*

Candida africana es la especie relacionada con *C. albicans* descrita en el 2001. La primera cepa se aisló de pacientes africanas que padecían candidiasis vulvovaginal y, en primer lugar, se consideraron cepas de *C. albicans* "atípicas". Odds et al. en 2007 incluyó *C. africana* en el clado 13 de *C. albicans* y apoyó un estado varietal (*C. albicans* var. *africana*). Un año después, el mismo grupo incluyó varias cepas de *C. africana* en un grupo muy diferente de la mayoría de *C. albicans* junto con *Candida stellatoidea* tipo I y otros aislados de *C. albicans* atípicos negativos a sacarosa, produce tubo germinativo pero no clamidosporas o clamidoconidias (13). Estos hechos apoyan el estado taxonómico controvertido de estos aislamientos, por tanto la clasificación taxonómica de *Candida africana* está en discusión, es considerada una nueva especie dentro del complejo *C. albicans* o una variedad inusual de *C. albicans* (11).

1.2.3 Especies frecuentes de *Candida*

Existen más de 150 especies de *Candida*, las que se aíslan con mayor frecuencia son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (actualmente denominada *Pichia kudriavzevii*) y *C. lusitaniae* (actualmente denominada *Clavispora lusitaniae*), esta frecuencia puede variar según el servicio hospitalario y las unidades de éste, e incluso según el país, la región y hasta de un año a otro. Aunque *C. albicans*

es la especie más aislada y la más patógena dentro del género, se está observando una disminución en su frecuencia, debido al incremento de especies no-*albicans* en todo el mundo (14–17).

1.3 Mecanismo de patogenicidad

El equilibrio entre la infección, la colonización y la eliminación depende de la capacidad de las cepas de *Candida* para modular la expresión de factores de virulencia en respuesta a los cambios del medio ambiente, combinado con la competencia del sistema inmune del huésped. Es considerada por ello un patógeno oportunista. Las relaciones con su hospedador, representadas en la Figura 2, cobran un importante papel en este tipo de infección. El estado fisiológico del hospedador es el primer factor que gobierna la etiología de las candidiasis, variaciones de este estado pueden desencadenar que las levaduras comensales se conviertan en patógenas, causando infecciones (5).



Figura 2. Esquema de las relaciones entre *C. albicans* y su hospedador. Extraído de Laforet, 2010 (5).

1.3.1 Factores de virulencia de *Candida*

Este género se ha caracterizado por un conjunto de factores de virulencia. La transición morfológica reversible entre levaduras, pseudohifas e hifas, adhesión a sustratos

biológicos, trans migración por procesos enzimáticos y/o físicos y modulación de la defensa inmunitaria del huésped (14).

Para permitir la invasión a los tejidos del huésped, las cepas de *Candida* poseen constitutivamente enzimas hidrolíticas que destruyen o alteran los constituyentes de las membranas. Las enzimas secretadas por *C. albicans*, que se cree reflejan su grado de patogenicidad, se clasifican en dos tipos principales de enzimas llamadas proteasas y fosfolipasas (8).

Los factores de adhesión favorecen la formación de biopelículas que son organizaciones microbianas que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero compuesto de glicocálix. Esto forma una matriz caracterizada por la adherencia y heterogeneidad, que proporciona resistencia contra defensas del hospedero, agentes antimicrobianos, detergentes, y capacidad de comunicación intercelular, que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen que pueden ser aparatos o dispositivos biomédicos como los implantes alterando o disminuyendo su funcionabilidad (18).

1.4 Candidiasis

Las candidosis o candidiasis son micosis primarias o secundarias causadas por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, especialmente *Candida albicans* (19).

La candidiasis es una infección cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico. Además de *C. albicans*, otras especies que pueden colonizar la mucosa oral y el tracto gastrointestinal humano son *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* (20).

La candidosis puede considerarse una enfermedad ocupacional, pues es común en individuos que laboran en ambientes húmedos o tienen contacto frecuente con alimentos de alto contenido de azúcares (pasteleros, cocineros, despatadoras manuales de fresa, empacadores de fruta, manipuladores de comestibles o despachadores en tiendas de alimentos, lavanderas y amasadores de pan). En esos individuos, la infección suele afectar las uñas de las manos (19).

1.4.1 Candidemia

La candidiasis invasora es una patología importante en la población de pacientes críticos, dada su frecuencia, elevada mortalidad y asociación a un incremento en los costos y estadía hospitalaria. Ésta se define como el aislamiento de alguna especie de *Candida*, en hemocultivos (candidemia) y/o en algún otro sitio estéril infectado por este patógeno. El cuadro clínico se manifiesta como un complejo conjunto de síntomas y signos, sin tener en general, elementos clínicos que lo hagan fácilmente distinguible de otras infecciones. Para su adecuado diagnóstico se requiere de un elevado nivel de sospecha y la adecuada valoración de factores de riesgo, síntomas y signos clínicos, así como de la presencia de colonización por *Candida* en otros sitios (21).

1.4.2 Candidiasis orofaríngea

Frecuentemente la candidosis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo del deterioro de la función inmunológica; por lo tanto, los episodios de candidosis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar, el deterioro de la respuesta inmune y los factores de virulencia que posee *Candida*, como la propiedad de adherencia, la habilidad de competir con otros microorganismos por nutrientes y la capacidad de evadir las defensas del hospedero, interactúan entre sí, aumentando la frecuencia de la candidosis en el paciente inmunosuprimido (22).

1.4.3 Candidiasis vulvovaginal

Candida es un hongo que se encuentra como parte normal de la microbiota vaginal, sin embargo, ésta puede sufrir alteraciones por causa de varios factores. Es un problema de salud que afecta a un gran número de personas de sexo femenino que han iniciado su vida sexual o están en un periodo de embarazo. Las especies de levaduras del género *Candida* más comunes son: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*. Esto provoca la emisión de flujo vaginal blanco, prurito, relaciones sexuales dolorosas y en caso de mujeres embarazadas puede causar abortos, si esta patología no es diagnosticada a tiempo (23).

1.4.4 Factores predisponentes del huésped

Los factores predisponentes para una infección por *Candida* son múltiples y pueden combinarse. En boca, por ejemplo, puede relacionarse con el uso de antisépticos orales, pérdida de espacio interdentario, prótesis inadecuadas o simplemente, falta de aseo bucal (22).

La presentación de infección fúngica invasora como la candidemia, se da en una proporción menor de pacientes, en particular aquellos que se encuentran hospitalizados, bajo terapia con antimicrobianos de amplio espectro, que se encuentran invadidos con algún dispositivo biomédico (catéter central, tubo oro-traqueal, entre otros) y/o con otros factores de riesgo (21).

Otros factores predisponentes para adquirir infecciones fúngicas pueden incluir: 1) cambios de pH; 2) enfermedades o procesos debilitantes tales como diabetes, tuberculosis, abscesos hepáticos amebianos, desnutrición; 3) inmunodeficiencias primarias o adquiridas como VIH/SIDA, leucemias, linfomas, agammaglobulinemias y enfermedad de Hodgkin; 4) factores iatrógenos como tratamientos con anticonceptivos orales o esquemas terapéuticos prolongados con antibióticos de amplio espectro, corticosteroides y citotóxicos; y 5) factores misceláneos, incluyendo dermatosis inflamatorias previas, traumatismos ungueales, extremos de la vida, menstruación y embarazo, empleo de catéteres intravenosos, y la prolongada permanencia en unidades de cuidados intensivos (UCI), entre otras causas (19).

Los cambios hormonales, uso de métodos anticonceptivos intrauterinos, mal aseo de la zona genital, sistema inmunológico debilitado, la diabetes y el embarazo son los factores de riesgo más comunes para la proliferación de *Candida* y provocar una micosis vaginal que puede presentarse de forma asintomática como sintomáticamente en las mujeres sexualmente activas (23).

1.5 Epidemiología

Las infecciones fúngicas se han incrementado en frecuencia e importancia en las últimas décadas, acompañadas de una alta mortalidad, generalmente ocasionadas por infecciones del torrente sanguíneo; causadas por especies del género *Candida*, en un 20 a 50 % de los casos (24). Aquellas infecciones intrahospitalarias producidas por *C. albicans* son cada vez más frecuentes, con elevada tasa de morbilidad y mortalidad,

sobre todo en aquellos pacientes con factores de riesgo para adquirirlas (25–33). Para las candidemias se describe una mortalidad cruda de 40 a 70 %, y una mortalidad atribuible de 20 a 40 %. En estas infecciones sistémicas aumentan los días de hospitalización (de 3 a 30 días) y el costo del cuidado del paciente si no se efectúa un tratamiento precoz (21,33).

En las unidades de cuidados intensivos, las infecciones causadas por especies de *Candida*, la sangre es el sitio más frecuente de aislamiento con 40,2 %, seguido por el de orina e infecciones de mucosas (15). En EE. UU., la candidiasis invasora representa el 75 % de las infecciones por hongos en pacientes hospitalizados, con una mortalidad que alcanza cifras hasta del 78 %. Esta tasa de mortalidad se reduce al 40 % si el tratamiento se instaura precozmente. En Latinoamérica *C. albicans* se presenta en una frecuencia del 34,3 %, seguida de *C. parapsilosis* 21 % y *C. tropicalis* 17 % (34).

C. glabrata y *C. parapsilosis* son especies cuya frecuencia se ha incrementado debido al empleo de fluconazol, como profilaxis antifúngica, al que *C. glabrata* presenta resistencia primaria. Dado los diferentes hábitats y los distintos factores de virulencia que desarrollan, las diversas especies de *Candida*, poseen características epidemiológicas propias que es bueno conocer para elegir el tratamiento más adecuado (34,35).

C. dubliniensis está distribuida a nivel mundial y se relaciona principalmente con candidiasis oral en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de 1,5 a 32,0 % (36,37). En pacientes sanos está generalmente ausente, no obstante un estudio realizado en Sudáfrica, 14,0 % de los caucásicos presentaban *C. dubliniensis* en la cavidad oral; también se han realizado estudios donde señalan la presencia de *C. dubliniensis* en otros tipos de muestras clínicas, que incluyen hemocultivos, secreciones vaginales, heces, en enfermos con o sin infección por VIH y en pulmones, y frecuentemente causando infecciones sistémicas fatales (38).

Estudios realizados en EE. UU., en pacientes pediátricos infectados por el VIH, permitieron confirmar genéticamente, mediante cariotipo electroforético, la presencia de *C. dubliniensis* en la cavidad oral de dichos pacientes (39). En México, *C. dubliniensis* se aisló en 6 % de pacientes inmunodeprimidos con predominio en pacientes con VIH (40). En Venezuela, se evaluó la incidencia de las especies de *Candida* en cavidad oral de niños sin síntomas clínicos de patología bucal y

desnutridos encontrándose 5 % de *C. dubliniensis* (41). En Cuba, se identificó en cavidad oral de 172 participantes adultos mayores, 63,8 % de *C. albicans* y 3,4 % de *C. dubliniensis*, factores asociados en diabéticos fueron la higiene deficiente y el uso de prótesis dental (42).

Por otra parte, en Argentina, pruebas realizadas en fluidos subgingival de individuos inmunocompetentes con enfermedad periodontal, permitieron comparar ensayos fenotípicos y moleculares en los cuales se observó el pequeño límite de diferencia entre ambas especies; fenotípicamente solo se pudo obtener una identificación presuntiva de *C. dubliniensis*, mientras que, con la caracterización molecular, a través del método de PCR, se llegó a su identificación definitiva (43). En el mismo país, en 287 cepas provenientes de secreciones vaginales analizadas se obtuvo una prevalencia de 1,39 % de *C. dubliniensis* y 0,35 % de *C. africana*. En otro estudio de 55 aislamientos del mismo origen clínico se determinó *C. dubliniensis* en 3,8 % de los casos, no se aisló *C. africana* en este estudio; ambos estudios se realizaron en pacientes no portadoras de VIH (11,44).

Otro estudio, realizado en Brasil por Matos, en el año 2009, donde se evaluó la microbiota fúngica en pacientes pediátricos con anemia falciforme, se diferenció *C. dubliniensis* de *C. albicans* realizando estudios filogenéticos con cebadores del intrón ACT1 (gen conservado de actina) y PCR con cebadores específicos de *C. dubliniensis* DUBR/DUBF (45). En el mismo país, en una colección de cepas, reportaron 2 % de *C. dubliniensis* en 548 aislados de diferentes materiales clínicos previamente identificados previamente como *C. albicans* (46). En otra población de pacientes con candidiasis oral portadores o no de VIH se obtuvo 5,4 % de *C. dubliniensis* mediante PCR (47).

También existen reportes de esta especie en el continente Europeo y Asiático, un estudio realizado en Irán, 83 cepas provenientes de infecciones respiratorias identificadas inicialmente como complejo *C. albicans*, se clasificaron luego del estudio molecular como *C. albicans* 89,15 %, *C. dubliniensis* 9,63 %, and *C. africana* 1,20 % (48). En Turquía, en 376 aislamientos de candidiasis vulvovaginal, se obtuvo igual prevalencia de *C. africana* y *C. dubliniensis* de 0,8 % (49). En Alemania, se detectó *C. dubliniensis* en 25 % de niños con caries en comparación con el grupo sin caries en

el cual no se aisló esta especie, esta diferencia resultó estadísticamente significativa, por lo que presumen podría estar relacionado con el desarrollo de caries (50).

En Japón detectaron el primer caso de candidemia por *C. dubliniensis* en un estudio prospectivo de nueve años (2002-2010), confirmando la presencia mediante el sistema VITEK® 2 de identificación de levadura y/o por la amplificación y secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) del ADNr (8).

1.6 Caracterización Microbiológica del complejo *C. albicans*

1.6.1 Métodos fenotípicos convencionales

Se basa en el estudio de las características micro y macromorfológicas de la levadura, así como la actividad enzimática y asimilación de sustratos. El método considerado como el estándar de oro para el aislamiento de *Candida* es el cultivo y es fundamental para efectuar pruebas de identificación, de sensibilidad a los antifúngicos y para realizar estudios de tipificación molecular. La principal limitación de este método es el tiempo en obtener resultados que oscila entre 24 a 48 h (51).

El ágar cromogénico constituye un medio de aislamiento primario selectivo que contiene sustratos cromogénicos que al actuar con enzimas producidas por las especies de *Candida* producen una coloración característica de cada una de las especies, además de una identificación presuntiva rápida de las principales especies de *Candida*, tiene la ventaja de detectar la presencia de cultivos mixtos de levaduras (52).

Entre las pruebas utilizadas se encuentran: la sensibilidad al estrés (temperatura, salinidad), crecimiento en medios selectivos cromogénicos, asimilación y fermentación de carbohidratos (maltosa, sacarosa, galactosa, celobiosa, xilosa y lactosa) (11,17,53–56). En la Tabla 2 se observa algunas pruebas bioquímicas y fenotípicas para la caracterización y diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, con una única prueba de las citadas no se puede realizar una identificación definitiva, ni descartar la presencia de *C. dubliniensis* en un aislamiento (57).

Tabla 2. Características fenotípicas para las especies *C. albicans*/ *C. dubliniensis*

Prueba	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>Crecimiento en agar ASG a 45 °C por 48 horas</i>	99 % de las cepas presentan crecimiento	En general ninguna cepa logra crecer
<i>Crecimiento en agar AGS a 42 °C por 48 horas</i>	Todas las cepas presentan buen crecimiento	9 % de las cepas logran crecer en estas condiciones
<i>Producción de clamidosporas en Agar arroz</i>	En general produce clamidosporas terminales	Produce clamidosporas agrupadas de a pares, tripletas o cadenas largas, pero no todas las cepas las producen
<i>Utilización de medio CHROMagar</i>	Produce colonias verdes azuladas a las 48 horas a 37 °C	Produce colonias verdes a las 48 horas a 37 °C, pero solo en cultivos primarios
<i>Caldo Hipertónico al 6,5 %</i>	Presencia de turbidez en el medio	No evidencia turbidez en el medio
<i>Actividad beta glucosidasa</i>	Presencia de actividad	Ausencia de actividad

ASG: agar Sabouraud glucosado. Extraído de Quesada *et al.*, 2007 (57).

1.6.2 Métodos comerciales

También se utilizan los sistemas comerciales estandarizados de asimilación de carbohidratos como: API® 20 C AUX, VITEK® 2 System, o API ID® 32 C (bioMérieux, Francia). Sin embargo, múltiples estudios realizados han evidenciado que aún no se puede excluir la presencia de *C. dubliniensis* basados en estos sistemas, debido a que aislamientos de esta especie han dado resultados con un perfil dudoso, o bien, una pobre identificación como *C. sake* o *C. albicans*. Esto debido a la cercanía genética, fenotípica y bioquímica de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (11,17,53,55,56).

El sistema VITEK® 2 (bioMérieux, EE. UU.) es un equipo que identifica y establece el patrón de sensibilidad de diversos microorganismos. La tarjeta YST permite identificar levaduras de importancia clínica y organismos relacionados a través de 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos y ácidos orgánicos y detección de oxidasas y arilamidasa. Diversos estudios

demonstraron que mediante este sistema se puede identificar correctamente más del 93 % de las cepas analizadas en aproximadamente 18 horas (58).

No obstante, estos métodos pueden no ser concluyentes, por ello, es fundamental emplear métodos de caracterización molecular que, a pesar de ser complejos y costosos para el uso rutinario en el laboratorio, proporcionan una identificación más específica.

1.7 Caracterización Molecular del complejo *C. albicans*

En 1995, el estudio de aislamientos atípicos de *Candida* provenientes de la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH, formaban tubo germinal y abundantes clamidosporas organizadas en tríos o en parejas contiguas. Serológicamente pertenecían al serotipo A y presentaban perfiles atípicos de asimilación de hidratos de carbono con relación a *C. albicans*. Los “*fingerprinting*” de ADN genómico utilizando la sonda 27A específica para *C. albicans* y cinco oligonucleótidos distintos, homólogos a las secuencias microsatélites, demostraron que tenían una organización genómica. Esto se estableció por RAPD (fragmentos polimórficos amplificados al azar) y análisis de cariotipo. La comparación del tamaño 500 pb de la región variable V3 de los genes de la subunidad ribosomal mayor, de nueve aislamientos atípicos que formaron un grupo homogéneo (100 % de similitud) que fue significativamente diferente de las otras especies de *Candida* analizadas, pero estaba más estrechamente relacionada con *C. albicans* y *C. stellatoidea*. Estos datos genéticos en combinación con las características fenotípicas de estos organismos atípicos apuntaron a la existencia de una nueva especie dentro del género *Candida* y se propuso el nombre de *Candida dubliniensis* (12,59).

La técnica de PCR, con sus numerosas variaciones, como Real Time PCR, PCR multiplex, PCR- EIA (Enzimoimmunoanálisis), PCR-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) y RAPD (Fragmentos polimórficos amplificados al azar) permite la identificación específica de *C. dubliniensis*, ya que los cebadores utilizados no amplifican muestras de ADN de *C. albicans* (60).

Varios son los blancos que se han estudiado hasta la fecha. Se han utilizado cebadores específicos dirigidas a amplificar diferentes regiones del ADN de la levadura, tales como, los genes proteasa aspártica secretada (SAP) y dipéptidil aminopeptidasa

1.8 Agentes antifúngicos

Los primeros antifúngicos desarrollados para tratar infecciones micóticas fueron los polienos y la 5-fluorocitosina, luego los imidazoles, después los triazoles y recientemente las equinocandinas, sordarinas y azoles de última generación. Con el desarrollo de los triazoles, específicamente fluconazol e itraconazol, se inició la profilaxis antifúngica y la terapia empírica en pacientes inmunodeprimidos con sospecha clínica de micosis. Esto trajo como consecuencia, la aparición de cambios epidemiológicos, tales como la aparición de cepas con resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de especies sensibles por otras con resistencia intrínseca (24,32). En la Tabla 3 se sintetizan los mecanismos de acción de los antifúngicos (66).

Tabla 3. Mecanismo de acción de los antifúngicos

Antifúngico	Diana	Mecanismo de acción	Actividad frente a <i>Candida</i>
Macrólidos poliénicos (nistatina, anfotericina B)	Ergosterol	Alteración de las propiedades de barrera de la membrana celular y efectos sobre vías de oxidación intracelulares	Fungicida
Azoles (ketoconazol, fluconazol, miconazol)	Citocromo P-450	Alteración de la fluidez permeabilidad celular	Fungistática
Flucitosina	ARN	Inhibición de la síntesis proteica	Fungistática
Equinocandinas	β -glucano sintasa	Alteración de la pared celular	Fungicida
Griseofulvina	Microtúbulos	Interfiere con el ensamblaje de los microtúbulos	Fungistática

Extraído de Estrella, 2010 (66).

1.8.1 Polienos

Los polienos son compuestos que poseen un efecto fungistático o fungicida según la concentración y la sensibilidad del hongo. Fueron los primeros agentes antifúngicos que se desarrollaron. Se conocen más de 100 compuestos, siendo los más importantes la anfotericina B y la nistatina (67).

1.8.1.1 Anfotericina B

La anfotericina B fue aislada en 1955 de un actinomiceto denominado *Streptomyces nodosus* y ha sido el fármaco más utilizado en el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas. Es un macrólido heptaeno con una molécula de nicosamida en un extremo y siete grupos hidroxilo en el otro. Se unen ampliamente a lipoproteínas del plasma. El volumen de distribución es elevado. Por la experiencia acumulada sigue siendo considerado el patrón en la comparación de nuevos fármacos antimicóticos. Puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección. Las preparaciones lipídicas de este fármaco ofrecen una menor toxicidad (67,68).

1.8.2 Azoles

Los antifúngicos azólicos o azoles, poseen un anillo imidazólico que contiene 2 o 3 nitrógenos (se dividen en imidazoles y triazoles). Los imidazoles (miconazol) tienen limitado espectro de actividad, escasa biodisponibilidad y posibilidad de efectos secundarios graves. Los triazoles poseen el mismo mecanismo de acción que los imidazoles, pero un espectro antifúngico superior y menos efectos secundarios. En la actualidad existen tres triazoles utilizados en el tratamiento de la infección fúngica invasora: fluconazol, itraconazol y voriconazol, y varios más en fases avanzadas de desarrollo (posaconazol, ravuconazol, etc.) (67).

1.8.2.1 Fluconazol

Es activo frente a la mayoría de las especies de *Candida*. *C. krusei* es inherentemente resistente al fluconazol y gran parte de cepas de *C. glabrata* son resistentes. Tiene buena actividad frente a la mayoría de los otros hongos filamentosos que causan infecciones invasivas. El fluconazol es una molécula hidrosoluble. Tiene una excelente

absorción por el tracto gastrointestinal, que no se ve afectada por el pH gástrico ni por los alimentos. A diferencia de los demás azoles, su baja unión a proteínas le permite una amplia distribución a los fluidos corporales y al líquido cefalorraquídeo (LCR). El fluconazol es un fármaco bien tolerado. La toxicidad hepática es poco frecuente con este medicamento (69,70).

1.8.2.2 Itraconazol

Tiene una excelente actividad frente a la gran mayoría de especies de *Candida*, incluidas aquellas resistentes al fluconazol. No tiene actividad frente a zigomicetos ni a *Fusarium*. Está indicado en el tratamiento de aspergilosis invasiva sin compromiso del sistema nervioso central. Por su mala penetración al sistema nervioso central (SNC) no es una buena opción en pacientes con meningitis. Es una molécula insoluble en agua. Este medicamento no se debe administrar en pacientes con insuficiencia cardíaca, por su efecto inotrópico negativo (70).

1.8.2.3 Voriconazol

Es activo frente a todas las especies de *Candida*, incluídas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, *Cryptococcus* sp., *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp. entre otros. Su uso en aspergilosis invasiva fue aprobado desde el 2002 en Estados Unidos y en la Unión Europea, reemplazando a la anfotericina B como primera línea de tratamiento. Es segunda línea de tratamiento en pacientes con candidiasis esofágica, pues, aunque su efectividad es comparable a la del fluconazol, con el voriconazol se presentan más efectos adversos. Voriconazol es una molécula pobremente soluble a pesar de su similaridad estructural con el fluconazol. Al igual que con los demás azoles, se puede desarrollar hepatotoxicidad (66,70).

1.8.2.4 Posaconazol

Es el azol con el mayor espectro antifúngico. Tiene una potente actividad in vitro contra la mayoría de las especies de *Candida* y *Aspergillus*. También es activo contra *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp., *Coccidioides* spp., *Penicillium marneffe*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, entre otros. Es el único azol con actividad contra los zygomycetos. Su uso está aprobado por la FDA (La

Administración de Medicamentos y Alimentos) para la profilaxis de infecciones por *Candida* y *Aspergillus* en pacientes severamente inmunocomprometidos y en candidiasis orofaríngea resistente al tratamiento con fluconazol o itraconazol. No requiere ajuste de la posología en pacientes con enfermedad renal. Su uso en pacientes con insuficiencia hepática no ha sido suficientemente estudiado, por lo que debe usarse con precaución en estos casos (70).

1.8.3 Equinocandinas

Son lipopéptidos sintéticamente modificados, derivados originalmente de la fermentación de caldos de diferentes hongos. Su grupo está conformado por la caspofungina, micafungina y anidulofungina. El espectro antifúngico de las equinocandinas está circunscrito a *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. Los tres antifúngicos son fungicidas in vitro e in vivo contra la mayoría de las cepas de *Candida* y fungistáticos contra *Aspergillus* (70).

1.8.4 Fluorocitosina

Es una pirimidina, la 5-fluorocitosina o flucitosina es un derivado fluorado de la citosina. Su utilización ha sido lastrada por su estrecho espectro de actividad, y por la rápida aparición de cepas resistentes dentro de las especies susceptibles cuando se usa como agente antifúngico único. La flucitosina es un antifúngico de espectro reducido con actividad prácticamente exclusiva frente a *Candida* y *Cryptococcus*, si bien algunas cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Zigomicetos* pueden ser sensibles (67,68).

1.8.5 Mecanismos de resistencia antifúngica

Los mecanismos de resistencia que *Candida* spp. puede presentar son variados. Frente a los azoles se conocen dos, uno es la alteración de la permeabilidad de la membrana, generando con ello una disminución de la entrada del fármaco, lo cual se da fundamentalmente por cambios en su contenido lipídico, pues se ha encontrado un considerable aumento del número de fosfolípidos en relación a los esteroides. El otro mecanismo es la alteración del sitio blanco, que para éste grupo de antifúngicos corresponde a la enzima 14- α desmetilasa (8,69).

La resistencia adquirida a azoles, que es la más conocida y estudiada, son inducidas

por bombas de eflujo codificadas por los genes MDR o CDR, y la adquisición de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima blanco de estos fármacos (gen ERG11). Si hay sobreexpresión de bombas de eflujo y mutaciones de ERG11, el nivel de resistencia a voriconazol y fluconazol es mucho más alto (efecto aditivo). Respecto a la resistencia adquirida de especies de *Candida* a equinocandinas, se ha identificado mutaciones en los genes FKS que codifican la subunidad mayor de la enzima blanco de estos antifúngicos (1,3- β -D glucan sintetasa) (24).

Algunos estudios indican que cepas de *C. dubliniensis* presentan concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) muy bajas a todos los antifúngicos ensayados; sin embargo, se han realizado estudios donde se demuestra que *C. dubliniensis* desarrolla resistencia *in vitro* al fluconazol y que estas cepas presentan una expresión elevada de transportadores de resistencia a múltiples drogas como MDR1 (49,71,72).

1.9. Métodos de determinación de la sensibilidad in vitro

La aparición de la resistencia a los agentes antifúngicos ha generado la necesidad de establecer métodos estandarizados in vitro de susceptibilidad antifúngica, reproducibles y con relevancia clínica, que permitan detectar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible o el desarrollo de resistencia durante el tratamiento (73).

Actualmente los documentos utilizados del CLSI (Instituto de estándares para el laboratorio clínico) son el M27 (2017) para el método de microdilución en caldo, y el M44 (2018) para el método de difusión en agar. El documento M60 (2018), es un suplemento de los documentos mencionados, que incluye las tablas actualizadas de CIM, el diámetro de inhibición y control de calidad de las pruebas de susceptibilidad antifúngica (74,75).

El método de microdilución en caldo es el método de referencia, para determinar la CIM de los antifúngicos frente a las levaduras. Sin embargo, esta metodología es laboriosa y de difícil aplicación en la rutina de los laboratorios hospitalarios. Actualmente se disponen de varias alternativas, como las pruebas por métodos de difusión por discos, una técnica estandarizada y reproducible de uso común en los laboratorios clínicos, pero limitada a algunas especies (73).

Los métodos comerciales surgieron como alternativas rápidas y más fáciles de

implementar que los métodos de referencia vigentes. Existen varios métodos comerciales disponibles que presentan buena concordancia con el método estandarizado por el CLSI. Uno de ellos es el Sensititre® YeastOne (TREK Diagnostic Systems), basado en la microdilución en caldo, pero con un sustrato cromogénico para facilitar la interpretación de la CIM. Otro es el Etest®, que involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, que permite determinar la CIM (76).

Por otro lado, también se dispone del sistema automatizado VITEK® 2 (BioMérieux, Francia), que presenta una buena correlación con el método de referencia, permite la identificación de levaduras y la determinación de la CIM utilizando una lectura espectrofotométrica. Varios estudios revelaron una alta reproducibilidad de los resultados y una concordancia entre el 90 % y el 99 % con el método de dilución en caldo del CLSI (58,77,78).

1.10 Situación de las candidiasis en Paraguay

Existen pocos datos relacionados con la portación de especies de *Candida* en la cavidad oral de pacientes infectados por VIH y la susceptibilidad antifúngica a los mismos. En 2006, Sanabria *et al*, analizaron hisopados orofaríngeos de pacientes con candidiasis infectados por VIH, en donde *C. albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia (58 %), seguida de *C. tropicalis* (23 %), *C. krusei* (16 %) y *C. glabrata* (2 %) (79). En otro estudio realizado en 2014, se analizaron diferentes materiales clínicos a excepción de hisopados orofaríngeos obteniendo un 40 % de *C. albicans*, como la especie más frecuente (80).

Aguilar *et al*, 2018, realizaron un estudio de 743 secreciones vaginales en embarazadas y no embarazadas, encontrando 82,6 % de *C. albicans* en los aislamientos y con mayor porcentaje en embarazadas. Así también en pacientes asintomáticas predominó aislamientos de *C. albicans* en embarazadas (81). Más adelante, realizan el primer reporte de 520 casos de candidemias en hospitales de Paraguay en el período 2010 - 2018, donde las especies prevalentes fueron *C. albicans* (34,4 %), *C. parapsilosis* (30,4 %), *C. tropicalis* (25,4 %), *C. glabrata* (4,8 %), *C. krusei* (2,1 %). Otras menos frecuentes fueron: *C. lusitaniae* (1,2 %), *C. guilliermondii* (1 %), *C. famata* (0,3 %),

C. rugosa (0,2 %) y *C. kefir* (0,2 %) (82).

En Paraguay aún no se han reportado estudios utilizando métodos moleculares para diferenciar las especies *C. albicans* de *C. dubliniensis*. La finalidad este estudio es diferenciar estas especies utilizando un método molecular estandarizado, obteniendo resultados más específicos y sensibles. Además, se pretende determinar el patrón de susceptibilidad in vitro de *C. albicans* a los diferentes antifúngicos utilizados comúnmente en el tratamiento y profilaxis de las candidiasis, para determinar una terapia preventiva adecuada, que evite los brotes a repetición y mejore la calidad de vida de los pacientes susceptibles. Por otra parte, se pretende determinar la CIM de los aislamientos de *C. dubliniensis*, por la falta de estudios, se desconoce hasta la fecha la implicancia clínica real de esta especie emergente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Diferenciar fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.
- Estandarizar una PCR dúplex convencional para la identificación molecular de ambas especies.
- Diferenciar molecularmente *C. dubliniensis* de *C. albicans* provenientes de aislamientos clínicos.
- Determinar la frecuencia de *C. dubliniensis* y *C. albicans* aisladas, según el origen de las cepas.
- Determinar la susceptibilidad a los antifúngicos de los aislamientos de *C. albicans* y la CIM de los aislamientos de *C. dubliniensis*.
- Comparar los valores de CIM de los aislamientos de *C. dubliniensis* determinados por el método de microdilución con otros valores reportados.
- Diferenciar fenotípicamente *C. dubliniensis* de *C. albicans* provenientes de aislamientos clínicos.
- Indagar posibles asociaciones entre la presencia de *C. dubliniensis* y las características clínicas y epidemiológicas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño de estudio y población

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transverso para la diferenciación fenotípica y molecular de aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* provenientes de diferentes muestras clínicas de pacientes ambulatorios y hospitalizados y la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos por el método comercial VITEK® 2 de cepas de *C. albicans*/ *C. dubliniensis* y la CIM por microdilución en el caso de *C. dubliniensis*.

La población enfocada corresponde a aislamientos de levaduras *Candida* de muestras clínicas de pacientes ambulatorios y hospitalizados. La población accesible corresponde a aislamientos de levaduras *Candida* de diferentes orígenes, recolectadas en el marco del Proyecto del CONACYT PINV15-919: titulada “Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados de Paraguay”, con aprobación del Comité Científico y de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS - UNA), con códigos P24/2015 y P19/2019 (Anexo A, B y C), en el periodo comprendido entre agosto del 2016 a diciembre del 2020. El tipo de muestreo fue no probabilístico de casos consecutivos.

Se incluyeron aislamientos de *Candida* aisladas de 896 pacientes de diferentes edades y ambos sexos, hospitalizados y ambulatorios, que fueron remitidas de varios laboratorios y centros del país tales como Laboratorio San Roque, Instituto de Previsión Social e Instituto de Medicina Tropical/PRONASIDA, Clínica de la Facultad de Odontología – UNA, al Laboratorio de Microbiología del IICS - UNA, para su identificación, con la ficha correspondiente y que se encuentran crioconservadas a –80 °C en el biobanco del Departamento de Microbiología. Los aislamientos de levaduras no viables o de color diferente a verde en medio cromogénico fueron excluidas del estudio.

La cantidad total de cepas estudiadas fue de 1090, superando el tamaño de muestra establecido en el protocolo, el cual corresponde a 1058 aislamientos (colonias color verde). Los aislamientos provinieron de diferentes orígenes clínicos tales como: cavidad oral (exudado faríngeo, saliva, dentina o placa), material respiratorio (esputo, secreción traqueal, BAL, otros), orina, secreciones varias (secreciones genitales, abscesos, exudados de herida, otros), catéter y sangre.

Los procedimientos para los estudios microbiológicos fenotípicos y moleculares se realizaron en el laboratorio de Microbiología del IICS/UNA y el estudio de la sensibilidad e identificación por VITEK® 2 en el Laboratorio San Roque.

3.2 Variables

- Especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, otros.
- Origen de los aislamientos: cavidad oral (exudado faríngeo, saliva, dentina o placa), material respiratorio (esputo, secreción traqueal, lavado broncoalveolar o BAL, otros), orina, secreciones varias (secreciones genitales, abscesos, exudados de herida, otros), catéter y sangre.
- Sensibilidad a los antifúngicos de los aislamientos de *C. albicans*: categorizadas como sensible (S), sensible dosis-dependiente (SDD) o resistente (R), según los puntos de corte clínicos establecidos por el CLSI (Manual M60)
- Características demográficas y clínicas de los pacientes de donde proceden los aislamientos: Sexo, edad, lugar de residencia, profesión, ambulatorio, hospitalizado, inmunocomprometidos con HIV o aparentemente inmunocompetente.
- Valor de CIM (Concentración inhibitoria mínima) de *C. dubliniensis*. Definida como la mínima concentración de antifúngico capaz de producir la inhibición visible en el crecimiento microbiano comparado con el control (Manual M27 CLSI).

- Resultado de las pruebas fenotípicas: Coloración en agar cromogénico, termotolerancia a 42 °C, crecimiento en medio hipersalino, actividad esterasa, coloración en agar tabaco, aspecto macroscópico en agar girasol, desarrollo de tubo germinativo y clamidoconidios en agar leche.

3.3 Flujograma de trabajo

Se analizaron 1090 aislamientos de *Candida* conservadas en medio BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion) con glicerol, provenientes de 896 pacientes, recolectados dentro del proyecto marco con código PINV15-919. Se realizó una caracterización previa en el Agar Cromogénico *Candida*, los aislamientos que desarrollaron colonias de color verdes fueron identificadas como *C. albicans* o *C. dubliniensis* por el método molecular PCR dúplex. Los aislamientos verdes con resultado de PCR negativo se identificaron por el método comercial VITEK® 2. Debido a la limitada disponibilidad de reactivos, la determinación de susceptibilidad antifúngica, se realizó a un subgrupo de 512 cepas de *C. albicans* por el método comercial VITEK® 2 (Figura 4). Las CIM de *C. dubliniensis* fueron comprobados por el método de microdilución, realizados en un laboratorio de Referencia: Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP). Para complementar la caracterización fenotípica, se realizó 6 pruebas fenotípicas a un subgrupo de *C. albicans* y a las cepas de *C. dubliniensis*.

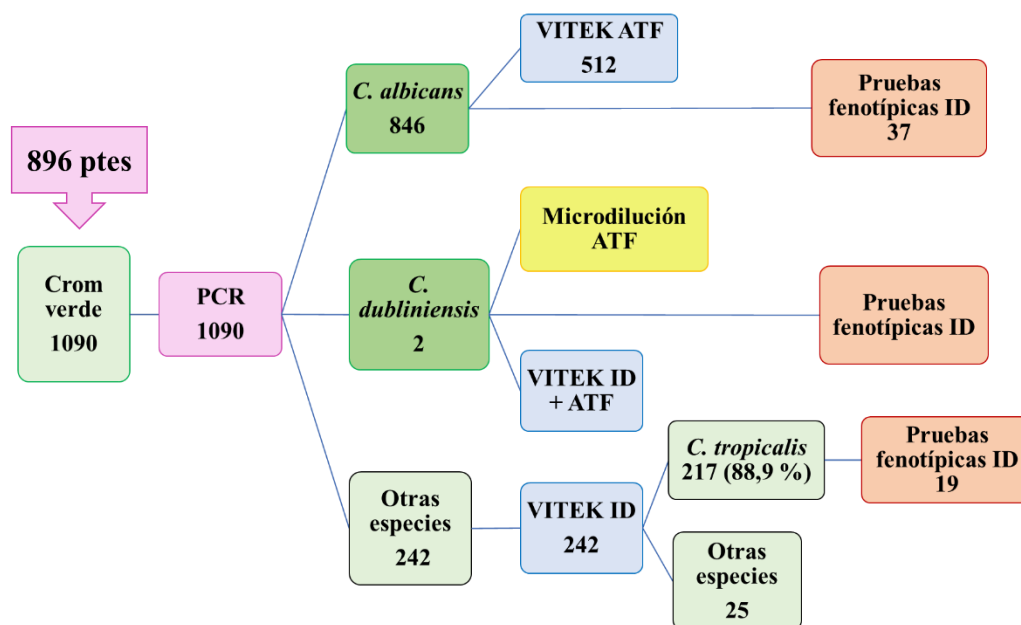


Figura 4. Flujograma de Trabajo.

3.4 Método de Cribado

3.4.1 Identificación presuntiva en Agar Cromogénico

Las cepas fueron cultivadas en placa de agar cromogénico Candida (CONDA® pronadisa, España), a 35 °C por 24-72 horas, en condiciones aeróbicas. Según el color y la textura que presentaron las colonias, se obtuvo una identificación presuntiva de las especies de *C. albicans*/ *C. dubliniensis* que desarrollaron coloración verde. La interpretación de microorganismos presuntivos proveídas por el fabricante se visualiza en la Tabla 4.

Tabla 4. Color de las colonias según la especie presuntiva de *Candida* aislada en el Agar Cromogénico Candida (CONDA- pronadisa) (83). (Anexo E)

Microorganismos presuntivos	Color
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Colonia verde
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Colonia azul
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	Colonia blanco claro-morado
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Colonia morada-rosa

Las colonias de levaduras que desarrollaron coloración verde en el medio cromogénico (*C. albicans* o *C. dubliniensis*) fueron subcultivadas en agar Sabouraud glucosado, sin antibióticos por 24 horas a 35 °C, y a partir de este cultivo se realizó la extracción de ADN para la identificación molecular por PCR dúplex, para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

3.5 Estandarización de la PCR dúplex

La estandarización de la PCR se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología del IICS/UNA, esta reacción diferencia entre las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*, mediante la amplificación del ADN ribosómico (ADNr) de la región espaciadora transcrita interna 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2), empleando los cebadores “CALF-CALR” y “CDUF-CDUR” para la amplificación específica de *C. albicans* y *C. dubliniensis*,

respectivamente, descritas por Ahmad *et al.*, 2012 (84). Los detalles de los cebadores se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencias de cebadores y tamaño de amplicones específicos para *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Gen blanco	Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)
ITS 2	CALF	TGG TAA GGC GGG ATC GCT T	100
	CALR	GGT CAA AGT TTG AAG ATA TAC	
ITS 1	CDUF	AAA CTT GTC ACG AGA TTA TTT TT	325
ITS 2	CDUR	AAA GTT TGA AGA ATA AAA TGG C	

Extraído de Ahmad *et al.* 2012 (84).

Controles

Para la optimización de la PCR se utilizó ADN de dos cepas controles positivos; una para *C. albicans* (ATCC 90028) y otra para *C. dubliniensis*, una cepa de colección caracterizada donada por un investigador asociado al Departamento de Microbiología del IICS, que fueron mantenidas en BHI glicerol a -80 °C. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción sin la adición de ADN.

3.5.1 Identificación molecular por PCR dúplex

Todos los aislamientos que desarrollaron coloración verde en medio cromogénico, identificados de forma presuntiva como *C. albicans*, fueron sometidos al estudio molecular. Estos fueron subcultivados a partir de una colonia aislada en el medio cromogénico en agar Sabouraud glucosado sin antibióticos por 24 - 48 h, incubados a 28 °C para la extracción de ADN. El mismo procedimiento fue realizado para los controles positivos, para la estandarización y prueba de la reacción de PCR.

Extracción del ADN: Los aislamientos que desarrollaron una coloración verde en el medio cromogénico, así como los controles positivos de *C. albicans*/ *C.dubliniensis*, fueron aislados en cultivo puro en agar sabouraud glucosado para la extracción de ADN utilizando un kit comercial Wizard® Genomic DNA (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones (85). En tubos eppendorf

de 1,5 mL se dispensaron 300 μ L del buffer de lisis (Nuclei Lysis Solution) y se resuspendió una cantidad suficiente de colonias. Se agregó una cucharadita de perlitas de vidrio de 0,5 mm a los tubos que se sellaron con parafilm. Se agitaron los tubos a máxima velocidad por 1 min y se les pasaron por baño de hielo 1 min (repitiendo estos dos pasos una vez más). Luego se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 2 min, y transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos de 1,5 mL. Se incubaron los tubos a 80 °C por 5 min, y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 1,5 μ L de RNasa (RNase A Solution) a cada tubo, y se mezcló invirtiendo 2 a 5 veces cada uno. Se incubaron a 37 °C durante 30 min y enfriaron a temperatura ambiente. Se agregó 100 μ L de solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution) a cada tubo y se continuó siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, el ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su uso.

Condiciones de Reacción

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ L, siguiendo las condiciones establecidas descritas por Ahmad et al. (2012) (84) con algunas modificaciones: 1,5 μ L de buffer 10 X, 0,15 μ L de 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en la mezcla (concentración final de 100 μ M de cada uno), 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM (concentración final 1,5 mM), 0,3 μ L de cada uno de los cebadores CALF/CALR y CDUR/CDUF concentración 10 μ M (concentración final 0,2 μ M) y 0,1 uL de Taq polimerasa 0,5 U (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, USA). A la mezcla se adicionó 2 μ L de ADN y las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 7 min. Se utilizó un termociclador Simpli Amp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA).

Detección del producto de amplificación

La visualización de los productos de extensión se evidenció en electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1 X. Con buffer de siembra, se colocó 5 μ L de cada amplificado y 5 μ L de un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (pb) (Jenna Bioscience, Alemania). La corrida se realizó en buffer TAE 1 X y las condiciones electrolíticas a utilizadas fueron 30 minutos a 100 Voltios.

Las bandas se revelaron utilizando un agente para visualización de ADN en geles Syber Safe DNA gel stain Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, USA) 6 µL por cada 100 mL de solución de agarosa al 2 %. Las bandas se evidenciaron en un transiluminador UV Digimage System GDS-01 (mrc, Israel) y se capturaron las imágenes con cámara fotográfica. El tamaño de los fragmentos esperados fueron aproximadamente para *C. albicans* 100 pb y *C. dubliniensis* 325 pb.

3.5.2 Límite de detección de la reacción de PCR

Se realizó la cuantificación del ADN de los controles positivos extraídos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* con un NanoDrop™ ((Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente se prepararon diluciones seriadas (1: 10) de los mismos controles. Estas diluciones fueron empleadas como molde para la reacción de PCR y de esta manera se determinó la concentración mínima detectada.

3.6 Estudio de la susceptibilidad a los antifúngicos

El perfil de susceptibilidad antifúngica se realizó a un subgrupo de 512 aislamientos de *C. albicans* por el sistema comercial VITEK® 2. Debido a la disponibilidad limitada de reactivos, no se estudió la totalidad de los aislamientos.

Los aislamientos de *C. dubliniensis* también fueron sometidos al mismo sistema y comprobados por el método de referencia de microdilución.

3.6.1 Método automatizado VITEK® 2

Se estudió la susceptibilidad de los 512 aislamientos de *C. albicans* y 2 aislamientos de *C. dubliniensis* por el método automatizado. Los antifúngicos ensayados fueron: fluconazol, voriconazol, anfotericina B, caspofungina, micafungina y flucitosina.

El método VITEK® 2 utilizado determina la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) basada en la metodología de microdilución en caldo del CLSI, la lectura lo realiza por espectrofotometría y la interpretación de los resultados de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el CLSI, 2018 (74) y para aquellos antifúngicos para los cuales el CLSI no dispone de puntos de corte utiliza los del EUCAST por sus siglas en inglés (Comité Europeo sobre Test de Sensibilidad Antimicrobiana).

Paneles de microdilución

Las tarjetas del sistema VITEK® 2 AST YSO7 provistas por el fabricante contienen una serie de diluciones seriadas de antifúngicos, estas diluciones se observan en la Tabla 6. Estas se conservaron a 2 - 8 °C hasta el momento de ser utilizadas.

Tabla 6. Diluciones de los antifúngicos contenidos en las tarjetas VITEK® 2 AST YSO7

Antifúngico	Abreviatura	Rango de dilución (µg/mL)
Fluconazol	FLU	1 a 16
Voriconazol	VRC	0,5 a 8
Anfotericina	AB	1 a 32
Caspofungina	CAS	1 a 8
Micafungina	MCF	0,06 a 4
Flucitosina	FCT	4 a 64

Inóculo para VITEK® 2

Cada aislamiento se subcultivó en agar Sabouraud glucosado y se incubó durante 48 h a 35 °C, para asegurar su pureza y viabilidad. Se realizó luego una segunda siembra en el mismo medio de cultivo, que fue incubado 24 h a 35 °C.

El inóculo fue preparado a partir de una suspensión de levaduras en 3 mL de solución fisiológica - agua destilada (1:1), hasta una turbidez equivalente a 1,8 - 2,2 de McFarland, utilizando el instrumento Densi-Check® (bioMérieux). Cada suspensión fue diluida apropiadamente, transfiriendo 280 µL a un tubo con 3 mL de solución fisiológica-agua destilada (1:1).

Siembra de las tarjetas AST YSO7

El inóculo preparado se dispensó en la tarjeta AST YSO7 a través de un tubo de poliestireno estéril. Los cassettes fueron colocados en el instrumento VITEK® 2; las tarjetas se llenaron e incubaron en el equipo y luego se leyeron por espectrofotometría. El tiempo de incubación varía de 11,7 a 26,5 h (promedio 15,5 h), en función de la tasa de crecimiento en el pocillo libre de droga. Los resultados de concentración inhibitoria mínima (CIM) se expresan en µg/ mL, de acuerdo con lo procesado por el software del instrumento.

Criterios establecidos para la interpretación de resultados

La CIM se define como la concentración más baja del antifúngico que inhibe el desarrollo de la levadura en un periodo definido de tiempo. A un valor específico de la CIM se le da una interpretación asignando categorías: Sensible (S), Intermedio (I), Resistente (R) y Sensible dosis dependiente (S- DD), esta última categoría para los azoles.

El VITEK® 2 interpreta los resultados de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI para azoles y equinocandinas (Tabla 7) y los establecidos por el EUCAST para la Anfotericina B (Tabla 8).

Tabla 7. Puntos de corte aprobados por el CLSI documento M60 (2017) para interpretar los estudios de sensibilidad de *Candida albicans* a azoles y equinocandinas (datos en µg/mL).

Antimicrobiano	Sensible	SDD	I	Resistente
Fluconazol	≤ 2	4		≥ 8
Voriconazol	≤ 0,12	0,25-0,5		≥ 1
Micafungina	≤ 0,25		0,5	≥ 1
Caspofungina	≤ 0,25		0,5	≥ 1

SDD: sensibilidad dependiente de la dosis. I: sensibilidad intermedia. Extraído de Wayne, 2017 (74).

La CIM de los azoles, equinocandinas y flucitosina es la concentración menor de cada uno de los respectivos antifúngicos que es capaz de inhibir por lo menos el 50% del desarrollo de la levadura comparando con el control de crecimiento sin antifúngico.

Tabla 8. Punto de corte aprobado por el EUCAST documento E.Def 7.3.1 para interpretar sensibilidad de *Candida albicans* frente a Anfotericina B (datos en µg/mL).

Antimicrobiano	Sensible	I	Resistente
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1

I: sensibilidad intermedia. Disponible en el sitio web de EUCAST [http:// www.eucast.org](http://www.eucast.org)

La CIM de la Anfotericina B está dada por la menor concentración de Anfotericina B que inhibe el desarrollo del ≥ 90 % comparado con lo obtenido en el control de crecimiento libre del antifúngico.

Actualmente, CLSI ni EUCAST no disponen de puntos de corte para flucitosina, por los que se utilizaron los puntos de corte del CLSI, documento M27-S3 si bien no están vigentes (Tabla 9).

Tabla 9. Puntos de corte del CLSI documento M60 (2017) para interpretar los estudios de sensibilidad de *Candida albicans* (datos en µg/mL).

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente
Flucitosina	≤ 4	8-16	≥ 32

I: sensibilidad intermedia. Extraído de Wayne, 2017 (75).

Para interpretar los resultados obtenidos para *C. dubliniensis*, se utilizó los puntos de corte para *C. albicans*, ya que no se dispone de puntos de corte clínicos específicos para esta especie.

3.6.2 Determinación de la CIM: Método Microdilución

En el caso de los aislamientos de *C. dubliniensis* se determinó la CIM por el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones del documento M27 del CLSI (2017), ya que actualmente no se dispone de puntos de corte clínicos en el manual CLSI para esta especie (75). Esto se llevó a cabo en un laboratorio de referencia, de manera a comprobar los valores obtenidos por el sistema VITEK® 2.

3.6.3 Control de calidad para determinación de la Susceptibilidad

Para el control de calidad, se utilizaron cepas de referencia ATCC recomendadas por el CLSI: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 (actualmente denominada *Pichia kudriavzevii*)

3.7. Estudio Microbiológico Fenotípico

3.7.1. Características Macroscópicas

Crecimiento en agar Sabouraud glucosado (ASD)

Se subcultivó en ASD sin antibióticos una colonia aislada verde y se incubó durante 24 - 48 h, a 28 °C para observar el aspecto de las colonias de levaduras. A partir de este cultivo puro se realizaron las demás pruebas fenotípicas.

Se observó el aspecto que desarrollaron, las colonias circulares, lisas, blancas, cremosas, de bordes precisos y centro ligeramente prominente son características de levaduras del género *Candida*.

Prueba de termotolerancia

Las colonias se sembraron en ASD y se incubaron a 42 °C durante 72 h para observar la capacidad de crecimiento a esta temperatura. *C. dubliniensis* no crece a temperaturas mayores de 37 °C.

Prueba de crecimiento en cloruro de sodio (NaCl) al 6,5 % y 11 %

Las colonias se sembraron en ASD al 6,5 % de NaCl y se incubaron a 37 °C por un máximo de 72 h para observar la capacidad de crecimiento en el medio hipersalino. Lo mismo se realizó en caldo al 11 % de NaCl. Las cepas de *C. albicans* desarrollan en el medio; por el contrario, *C. dubliniensis* no es capaz de desarrollar en medio hipersalino.

Desarrollo en agar tabaco (AT)

Las colonias se sembraron en AT y se incubaron 28 °C durante 48-72 h para observar el color que las colonias desarrollan en este medio. En general, las colonias de *C. albicans* son blancas y de aspecto liso; en cambio, las colonias de *C. dubliniensis* son doradas y de aspecto más rugoso en este medio (86).

Desarrollo en agar girasol (AG)

Las colonias se sembraron en AG y se incubaron 28 °C durante 48-72 h para observar el aspecto que las colonias desarrollan en este medio.

Las colonias de *C. dubliniensis* presentan aspecto más rugoso en este medio.

Detección de actividad esterasa en medio de opacidad

Se utilizó el medio con Tween 80 al 1 % y CaCl₂ al 0,1 %. Se sembró en forma de círculo de 1 cm de diámetro y se incubó a 30 °C durante 72 horas. Colonias de *C. albicans* desarrollan un halo de opacidad alrededor de la colonia (87).

3.7.2 Características Microscópicas

Formación de tubos germinativos: Se observó una prolongación filamentosa proveniente de la célula levaduriforme madre en el medio agar leche, luego de incubar a 37 °C hasta un máximo de 3 h.

Producción de clamidosporas

Se observaron estas estructuras en el microscopio a 400X, en un examen en fresco o directamente de la placa del cultivo en agar girasol o en agar leche, luego de la incubación a 28 °C por 72 h de estos medios (87).

3.7.3 Identificación fenotípica por VITEK® 2 (bioMérieux, Francia)

Las cepas con colonias verdes, que no fueron identificadas por el método molecular PCR dúplex, fueron identificadas mediante el perfil de asimilación de carbohidratos del sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux, Francia), utilizando las tarjetas desechables, VITEK® 2 YST ID.

Cada cepa fue sub-cultivada desde el medio cromogénico al agar Sabouraud glucosado e incubada 24 horas a 35 °C. El inóculo para el sistema VITEK® 2, fue preparado a partir de la suspensión de levaduras, en 3 ml de solución fisiológica - agua destilada (1:1), hasta una turbidez equivalente a 1,8-2,2 de McFarland, utilizando el densitómetro DEN-1B (BioSan®). El inóculo final se dispensó en la tarjeta YST ID a través de un tubo de poliestireno estéril, y se incubó en el equipo VITEK® 2. Los datos obtenidos de cada prueba fueron interpretados según la base de datos del instrumento, para tipificar al microorganismo en estudio.

3.8 Asuntos estadísticos

3.8.1 Tamaño de la muestra: Se estimó el tamaño de la muestra considerando la frecuencia esperada de *C. dubliniensis* de 6,1 % encontrado en un estudio realizado en Argentina en aislamientos recolectados de varios orígenes clínicos (87). Para un nivel de confianza del 95 % y un margen de error de 1,5 % se requiere de 1058 cepas de colonias de color verde, obtenida en agar cromogénico *Candida* (Cálculo realizado con Epi Info versión 7.2.2.16).

3.8.2 Gestión y análisis de los datos: Los datos fueron consignados en una hoja de cálculo de Microsoft Excell y posteriormente analizados con el paquete estadístico Epi Info versión 7.2.2.16. Se utilizó estadística descriptiva para resumir los datos como frecuencia absoluta y relativa porcentual.

3.9 Asuntos éticos

El protocolo de la Tesis fue aprobado previa autorización del responsable del Proyecto marco PINV15-919 del cual derivan los aislamientos utilizados y cuenta con la aprobación del Comité Científico y de Ética del IICS- UNA, con código P19/2019 (Anexo A). Así también, previa conformidad con el Departamento de Microbiología- IICS (Anexo B).

El estudio se realizó respetando los principios éticos de la investigación clínica: *Respeto, beneficio y justicia*. Se utilizaron cepas conservadas en el biobanco, manteniendo la confidencialidad: los datos clínicos, demográficos y resultados de los pacientes de los cuales provienen las cepas fueron resguardados mediante el uso de códigos. Se respetaron todas las autorías del Proyecto Marco PINV15-919. Solo los investigadores tuvieron acceso a los datos mencionados.

3.10 Control de Calidad

Pruebas previas

Se realizó un ensayo previo con los seis primeros aislados de *Candida* con el objetivo de evaluar las técnicas a ser empleadas. Para el control del cultivo en medio Sabouraud, se incluyó una cepa ATCC por grupo procesado, verificando si el mismo se encontraba en condiciones apropiadas que permitieran el crecimiento de las levaduras. Lo mismo se realizó para el cultivo en el agar cromogénico *Candida*, se incluyeron los controles *C. albicans* ATCC 90028/ *C. dubliniensis*, con la finalidad de comparar los colores obtenidos. Otras cepas de referencia ensayadas fueron *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Para *C. dubliniensis* se utilizó una cepa caracterizada, donada por un investigador asociado. En ambos casos, se incluyó un medio sin inoculación como control negativo, para descartar posibles contaminaciones (Anexo F).

Controles utilizados para el estudio molecular: Como controles positivos se utilizó para *C. albicans*, una cepa de referencia ATCC 90028 (por sus siglas en inglés, American Type Culture Collection) y para *C. dubliniensis*, una cepa caracterizada como *C. dubliniensis* donada al Departamento de Microbiología del IICS- UNA por un investigador asociado.

Controles utilizados para el estudio de la susceptibilidad: Se utilizaron dos controles recomendados por el CLSI por sus siglas en inglés (Clinical and Laboratory Standards Institute), *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 (actualmente denominada *Pichia kudriavzevii*) (16).

4. RESULTADOS

4.1 Características demográficas de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 1090 aislamientos de levaduras provenientes de 896 pacientes de ambos sexos, hospitalizados y ambulatorios de varios servicios de Salud de Asunción. En la Tabla 10, se presentan las características demográficas de los pacientes y las instituciones donde fueron colectadas las muestras.

Tabla 10. Características demográficas de los pacientes n= 896

Características	Frecuencia	Porcentaje
Sexo n= 891 *		
Femenino	469	52,3
Masculino	422	47,1
Edad (años) n= 661 **		
≤ 20	74	11,2
21 - 40	214	32,4
41 - 60	189	28,6
61 – 80	134	20,3
> 80	50	7,6
Estatus hospitalario		
Ambulatorio	304	33,9
Internado	592	66,1
Estado inmunológico		
Inmunocomprometido con HIV	229	25,6
Inmunocompetente	667	74,4
N° aislamientos		
1	750	83,7
2	117	13,1
3	21	2,3
4	3	0,3
5	1	0,1
6	3	0,3
8	1	0,1
Institución		
Instituto de Previsión Social	406	45,3
Laboratorio San Roque	199	22,2
Instituto de Medicina Tropical/PRONASIDA	195	21,8
Clínica de la Facultad de Odontología - UNA	32	3,6
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud	64	7,1

* 5 sin información **235 Sin información

La media observada de edad fue 46 años y la desviación estándar de 23 años, con un rango muy amplio de 0 a 99 años. 26,2 % (235/896) de pacientes no contaban con datos de edad, lo que puede aumentar el sesgo en esta variable. Un grupo de 16,3 % (146/896) de pacientes desarrollaron aislamientos múltiples, de 2 a 8 aislamientos, con predominio de 2 aislamientos en este grupo. Los aislamientos provinieron de diversas muestras clínicas predominantemente de orina, muestras respiratorias e hisopado de fauces (Tabla 11).

Tabla 11. Origen de los aislamientos de *Candida* spp. n= 1090

Origen	Frecuencia	Porcentaje
Orina	283	26,0
Material respiratorio ^a	264	24,2
Hisopado faríngeo	223	20,4
Secreciones varias ^b	98	9,0
Sangre	93	8,5
Cavidad bucal ^c	65	6,0
Catéter	41	3,8
Piel y Anexos	23	2,1

^a Esputo, secreción traqueal, BAL ^b abscesos, secreciones genitales ^c Dentina, placa, hisopado dientes

4.2. Cribado de las cepas del complejo *Candida albicans*

Desarrollo en medio cromogénico (CONDA®)

Las muestras fueron inoculadas en un medio cromogénico, luego de 48 h de incubación a 35 °C, se seleccionaron aquellas colonias que desarrollaron color verde en el medio (Figura 5), estos colores se contrastaron con los colores de controles de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, y se clasificaron como verde, verde claro y verde oscuro ya que presentaron diferentes tonalidades; verde a los que presentaron similitud con los controles de *C. albicans*/*C. dubliniensis*, verde claro, aquellos que presentaron una tonalidad más clara con relación al color de los controles, y verde oscuro a aquellos de tonalidad más oscura incluyendo a aquellos que presentaban un tono verde azulado.

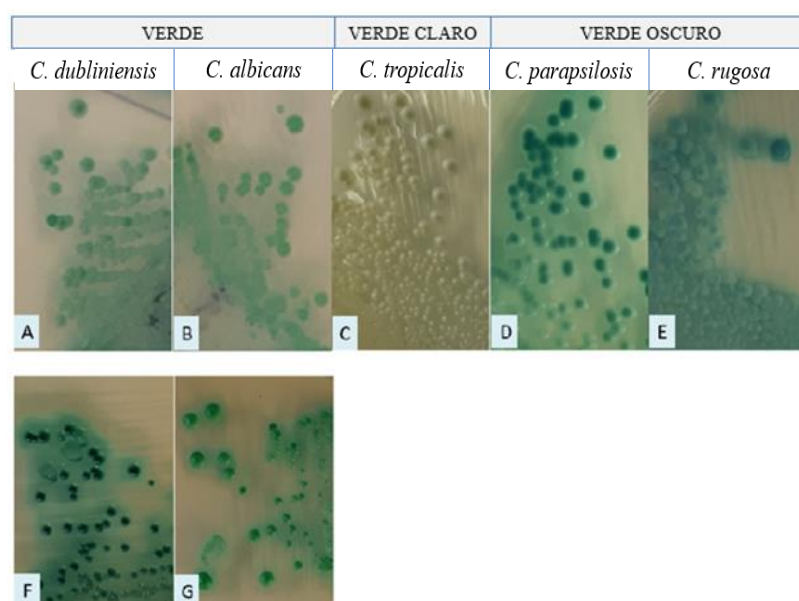


Figura 5. Crecimiento de levaduras en agar cromogénico Candida (CONDA®) 48 h de incubación a 35 °C. A y B) Coloración verde de colonias de controles de *C. dubliniensis* y *C. albicans*, respectivamente. C) Coloración verde claro de un aislamiento de *C. tropicalis*. D y E) Coloración verde oscuro de aislamientos de *C. parapsilosis* y *C. rugosa*. F y G) Tonalidades de verde observados luego de 72 h de incubación a 35 °C de controles de *C. dubliniensis* y *C. albicans*, respectivamente.

En la Tabla 12 se observa la clasificación de todos los aislamientos según los colores que desarrollaron en el medio cromogénico. Fue característico el verde para la especie *C. albicans*, verde con un centro más oscuro para *C. dubliniensis*, esta característica es casi imperceptible a las 48 h, y requiere de un adiestramiento en la lectura. Aquellos que desarrollaron color verde claro en su mayoría fueron especies de *C. no albicans*. Salvo algunas excepciones la mayoría de las cepas verdes fueron tipificadas como *C. albicans* por metodología molecular. El uso de este medio para el aislamiento primario proporciona una identificación presuntiva y es capaz de diferenciar entre múltiples aislamientos de levaduras presente en una muestra.

Tabla 12. Desarrollo de tonalidades en agar cromogénico (CONDA®). n= 1090

Color	Frecuencia	Porcentaje
Verde	840	77
Verde claro	236	21,7
Verde oscuro	14	1,3
Total general	1090	100

4.3 Estudio Molecular

Estandarización de la PCR

Se llevó a cabo la PCR dúplex, utilizando las condiciones de reacción descritas por Ahmad, et al. 2012 (84), con algunas modificaciones, como un volumen final de reacción más pequeño, menor concentración de la enzima Taq ADN polimerasa pero mayor concentración de dNTPs. Se empleó como molde ADN de controles positivos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, Cada control se ensayó por triplicado y el control negativo correspondió a una cepa de *C. tropicalis* y la mezcla de reacción sin la adición de ADN. De esta manera se evidenció bandas de tamaño característico para ambas especies, comparando con un patrón de peso molecular de 50 pb, se comprobó el tamaño generado para *C. dubliniensis* de aproximadamente 425 pb y para *C. albicans* de aproximadamente 100 pb. En la Figura 6 se observa los resultados de la corrida electroforética de la PCR dúplex de controles positivos para *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Una vez comprobado la especificidad de la reacción, con los cebadores y condiciones de ciclado utilizadas, se preparó diluciones seriadas de cada control positivo y se ensayó por separado. Los resultados se observan en la Figura 7 y 8. Con un nanodrop se determinó la concentración de ADN inicial de cada control que fue de 12,5 ng/μL para *C. dubliniensis* y 33,4 ng/μL para *C. albicans*.

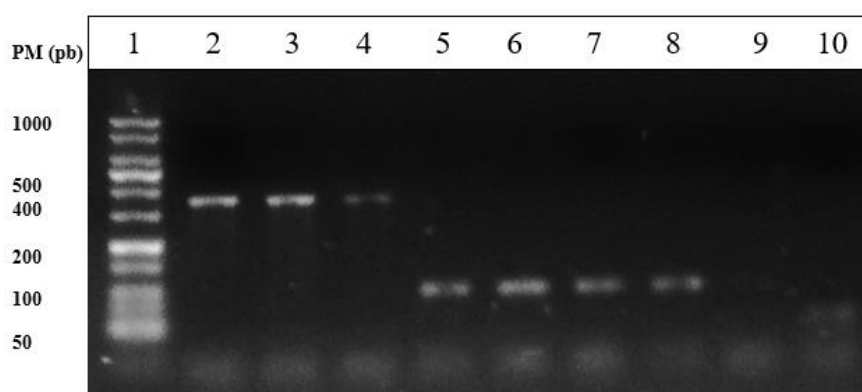


Figura 6. Estandarización de la PCR dúplex. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %: Carril 1: Marcador de peso molecular (PM) 50 pb; Carriles 2, 3, 4: controles positivos de *C. dubliniensis* (325 pb); Carril 5, 6, 7: controles positivos de *C. albicans* ATCC 90028 (100 pb); Carril 8: cepa de *C. albicans* (100 pb) de pacientes; Carril 9: cepa de *C. tropicalis* (control negativo); Carril 10: control negativo.

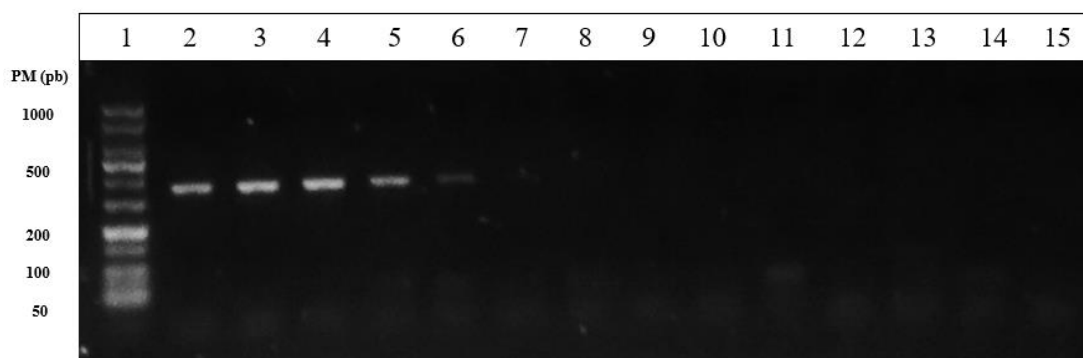


Figura 7. Límite de detección de la PCR dúplex para *C. dubliniensis*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %. Carril 1: PM; Carril 2: control positivo *C. dubliniensis* (325 pb) 12,5 ng/μL; Carriles 3 al 13: diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} ; Carriles 14-15: controles negativos.

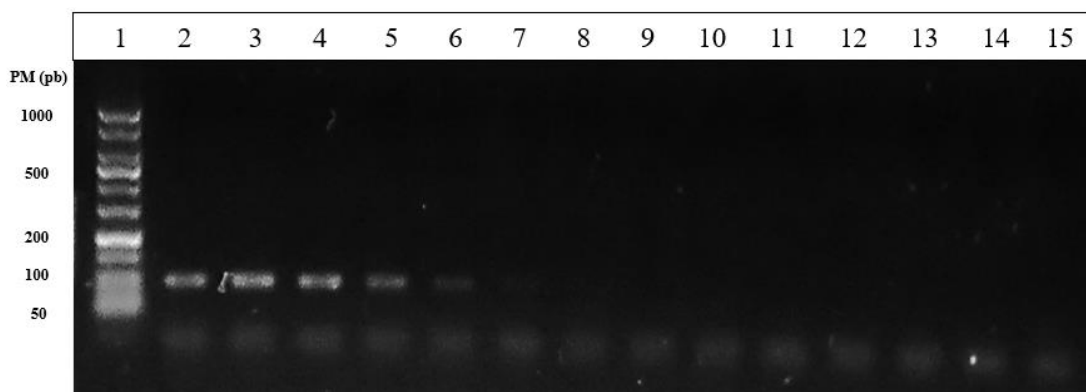


Figura 8. Límite de detección de la PCR dúplex para *C. albicans*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %. Carril 1: PM; Carril 2: control positivo *C. albicans* (100 pb) 33,4 ng/μL; Carriles 3 al 13: diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} ; Carriles 14-15: controles negativos.

Con ambos controles se observó banda detectable en el gel de agarosa hasta la dilución 10^{-4} . Cabe resaltar que la intensidad de las bandas de *C. dubliniensis* fueron más intensas aún con menor concentración de ADN de partida. Posteriormente, se ensayó el sistema dúplex empleando como molde una mezcla de ADN de controles *C. albicans*/ *C. dubliniensis* en la proporción (1:1) de concentración ajustada a 10 ng/μL cada uno, a esta mezcla se realizó diluciones seriadas (1:10). En la Figura 9 se observa este sistema integrado, donde se ensaya simultáneamente ambas especies, por lo que se observa 2 bandas de tamaño específico.

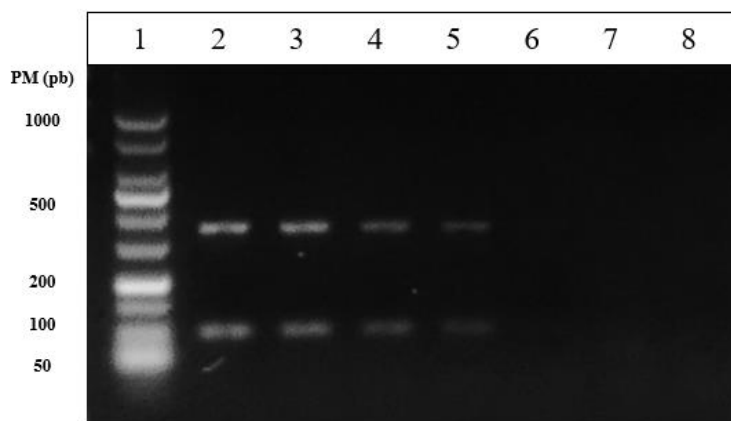


Figura 9. Límite de detección de la PCR dúplex para la mezcla de ADN de *C. albicans*/ *C. dubliniensis*. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %. Carril 1: PM; Carriles 2 al 7: diluciones de ADN de *C. albicans*/*C. dubliniensis* (100/325 pb) 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Carril 8: control negativo.

En todos los casos el límite de detección que corresponde a la última dilución que presenta bandas visibles de amplificación en el gel de agarosa y fue del orden de $10 \cdot 10^{-4}$ ng/ μ L para la mezcla utilizada. En general las bandas observadas correspondientes a *C. dubliniensis* fueron más intensas que *C. albicans*, probablemente esta especie tenga mayor número de copias de la región blanco o los cebadores presenten mayor especificidad que para *C. albicans*.

Estudio molecular de los aislamientos

A todas las colonias de levaduras que desarrollaron coloración verde en medio cromogénico (1090) se les realizó un subcultivo en medio sabouraud para el aislamiento de un cultivo puro, al que posteriormente se extrajo el ADN y se sometió a la reacción de PCR dúplex para confirmar la especie. Los resultados se observan en la Figura 10.

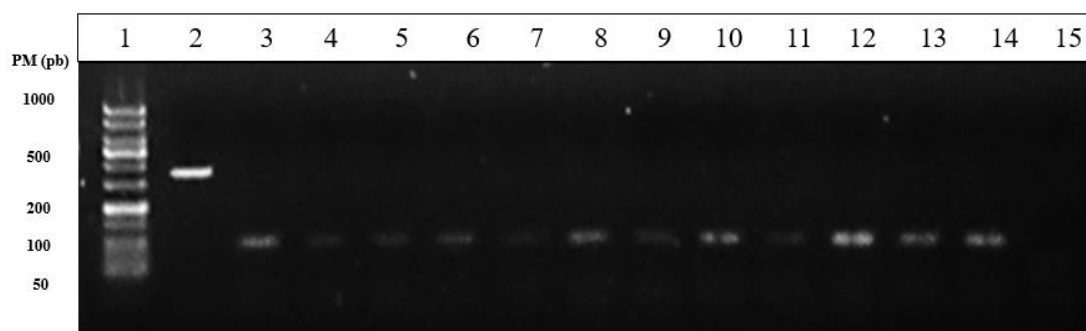


Figura 10. PCR dúplex de aislamientos de pacientes. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %. Carril 1: PM de 50 bp; Carril 2: control positivo *C. dubliniensis* (325 pb); Carril 3: control positivo *C. albicans* (100 pb); Carriles 4-14: muestras positivas para *C. albicans* (100 pb); Carril 15: control negativo.

Se ha empleado de manera satisfactoria la técnica de PCR dúplex para la detección y diferenciación en una sola reacción, de aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans* provenientes de diferentes muestras clínicas (Figura 10 y Tabla 13). *C. albicans* fue la especie más frecuentemente identificada por PCR dúplex en 77,6 % de los aislamientos. Se han aislado dos cepas de la especie de *C. dubliniensis*. Estos aislamientos provenían de la cavidad bucal de dos pacientes del sexo femenino y con edades aproximadas a 50 años.

Tabla 13. Resultado de la PCR dúplex de los aislamientos de pacientes. n= 1090

Identificación molecular	Frecuencia (%)	IC 95 %
<i>C. albicans</i>	846 (77,6)	75,05 - 79,99
<i>C. dubliniensis</i>	2 (0,2)	0,05 - 0,67
Negativo	242 (22,2)	19,83 - 24,76
Total	1090	

En la Tabla 14 se presentan los resultados de la PCR dúplex según el color desarrollado en el medio cromogénico. La mayoría de las cepas de *C. albicans* desarrollaron color verde salvo algunas excepciones que se clasificaron como verde claro u oscuro. Las dos cepas de *C. dubliniensis* desarrollaron una coloración verde casi indistinguible de *C. albicans*. 97,0 % (229/236) de las cepas clasificadas como verde claro dieron PCR negativa para las especies *C. albicans/ C. dubliniensis*, por lo tanto, corresponden a otras especies de *Candida* spp. que posteriormente fueron identificadas por el método comercial VITEK® 2.

Tabla 14. Resultado de la PCR dúplex según el color desarrollado en medio cromogénico. n= 1090

Color	PCR dúplex			Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	Negativo	
Verde	838 (99,8 %)	2 (0,2 %)		840
Verde claro	7 (3,0 %)		229 (97,0 %)	236
Verde oscuro	1 (7,1 %)		13 (92,9 %)	14
Total general	846 (77,6 %)	2 (0,2 %)	242 (22,2 %)	1090

4.4 Identificación por método VITEK® 2

Los aislamientos que se clasificaron como verde claro o verde oscuro en el medio cromogénico, que resultaron PCR negativa, fueron identificados por VITEK® 2, obteniéndose los siguientes resultados presentados en la Tabla 15. La mayoría de los aislamientos de *Candida spp.* correspondió a especies de *C. tropicalis* con excelente porcentaje de discriminación de 97 - 99 %, según el análisis de la base de datos del instrumento. Los aislamientos de *C. dubliniensis* previamente identificados por PCR también fueron identificados correctamente por esta metodología, pero con un porcentaje de identificación menor de bueno a muy bueno de 91 - 93 %.

Tabla 15. Identificación de *Candida spp.* por VITEK® 2, según el color desarrollado en agar cromogénico. n= 244

Identificación VITEK® 2	Desarrollo en agar cromogénico			Total
	Verde	Verde claro	Verde oscuro	
<i>C. tropicalis</i>		211 (92,1 %)	6 (46,2 %)	217 (88,9%)
<i>C. parapsilosis</i>		3 (1,3 %)	3 (23,1 %)	6 (2,4 %)
<i>C. lusitaniae</i>		4 (1,8 %)		4 (1,7 %)
<i>C. dubliniensis</i>	2 (100 %)			2 (0,8 %)
<i>C. intermedia</i>		2 (0,9 %)		2 (0,8 %)
<i>C. famata</i>		1 (0,4 %)		1 (0,4 %)
<i>C. haemulonii</i>		1 (0,4 %)		1 (0,4 %)
<i>C. rugosa</i>			1 (7,7 %)	1 (0,4 %)
<i>C. zeylanoides</i>			1 (7,7 %)	1 (0,4 %)
<i>K. ohmeri</i>		1 (0,4 %)		1 (0,4 %)
No identificado*		6 (2,7%)	2 (15,3 %)	8 (3,4 %)
Total general	2	229	13	244 (100 %)

*Baja discriminación del instrumento

Teniendo en cuenta las identificaciones realizadas por metodología molecular y VITEK® 2, se obtuvo la identificación final de todos los aislamientos incluidos en el estudio como se observa en la Tabla 16. Las especies con mayor frecuencia fueron *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*. En menor proporción se determinaron otras especies. Teniendo en cuenta que se trata de aislamientos de coloración verde en medio cromogénico (pero de distintas tonalidades) el resultado obtenido es el esperado, ya que presuntivamente se trataban de *C. albicans* según el color desarrollado. Una pequeña proporción de aislamientos (0,7 %) no fueron identificados pues presentaron baja discriminación por el sistema VITEK® 2.

Tabla 16. Identificación final de todos los aislamientos. n=1090

Especie	Frecuencia	Porcentaje	Intervalo de confianza 95 %
<i>C. albicans</i>	846	77,6	75,05 – 79,99
<i>C. tropicalis</i>	217	19,9	17,65 – 22,38
<i>C. parapsilosis</i>	6	0,5	0,25 – 1,20
<i>C. lusitaniae</i>	4	0,4	0,14 – 0,94
<i>C. dubliniensis</i>	2	0,2	0,05 – 0,67
<i>C. intermedia</i>	2	0,2	0,05 – 0,67
<i>C. famata</i>	1	0,1	0,02 – 0,52
<i>C. haemulonii</i>	1	0,1	0,02 – 0,52
<i>C. rugosa</i>	1	0,1	0,02 – 0,52
<i>C. zeylanoides</i>	1	0,1	0,02 – 0,52
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	0,1	0,02 – 0,52
No identificada*	8	0,7	0,37 – 1,44
Total	1090	100	

*PCR dúplex negativo y bajo % de discriminación por VITEK® 2

Con relación a la distribución de las especies según el origen de los aislamientos, *C. albicans* predomina en todos los orígenes, con menor frecuencia en orina, catéter y sangre; donde la frecuencia de *C. tropicalis* es mayor con relación a los otros orígenes. En el hisopado faríngeo se desarrollaron mayor número de especies, si bien se encontraban en muy baja frecuencia (Tabla 17, Anexo H).

Tabla 17. Distribución porcentual de especies de *Candida* según el origen de los aislamientos. n=1090

Especie	Material respiratorio ^b	Hisopado Faríngeo	Orina	Secreciones varias ^c	Cavidad bucal ^d	Sangre	Catéter	Piel y anexos
<i>C. albicans</i>	85,2	86,1	67,5	83,7	83,1	57	63,4	100
<i>C. tropicalis</i>	13,6	10	31,4	14,3	12,3	36,5	34,2	
<i>C. parapsilosis</i>		0,5		2		3,2		
<i>C. lusitaniae</i>		1,4	0,4					
<i>C. dubliniensis</i>		0,5			1,5			
<i>C. intermedia</i>		0,5					2,4	
<i>C. rugosa</i>						1,1		
<i>C. zeylanoides</i>		0,5						
<i>C. famata</i>						1,1		
<i>K. ohmeri</i>	0,4							
No identificada ^a	0,8	0,5	0,7		3,1	1,1		

^aPCR dúplex negativo y bajo % de discriminación por VITEK® 2 ^besputo, secreción traqueal, BAL

^cabscesos, secreciones genitales ^ddentina, placa, hisopado dientes

4.5 Perfil de sensibilidad de los aislamientos estudiados

A un subgrupo de 512 aislamientos de *C. albicans* se determinó la sensibilidad a fluconazol, voriconazol, anfotericina B, caspofungina, micafungina y flucitosina por VITEK® 2 cuyos resultados se observan en la Tabla 18.

El 95,6 % de los aislados de *C. albicans* fueron sensibles a fluconazol, 91,2 % a voriconazol, en el caso de los azoles incluyendo los SDD, 99 % a anfotericina B, 100 % a caspofungina y micafungina y 96,9 % a flucitosina. El 8,8 % y 4,4 % de las cepas fueron resistentes a Voriconazol y Fluconazol, respectivamente.

En la distribución de CIM frente a azoles en función del origen de los aislamientos (Anexo G), se puede observar un predominio en la frecuencia de valores bajos de CIM en casi todos los aislamientos, resaltan los valores de CIM observados en aislamientos de piel y anexos que tienen alta frecuencia de cepas sensibles dosis dependientes y resistentes, sobre todo porque son sitios donde la levadura podría encontrarse como colonizante.

Tabla 18. Perfil de sensibilidad a los antifúngicos de cepas de *C. albicans*. n= 512

Antifúngico			
CIM (µg/mL)	Fluconazol		
≤0,5	341	S	480 (93,8 %)
≤1	99		
1	25		
2	15		
4	9	SDD	9 (1,8 %)
8	13	R	23 (4,4 %)
16	8		
32	2		
Voriconazol*			
≤ 0,12	448	S	448 (87,7 %)
0,25	14	SDD	18 (3,5 %)
0,5	4		
1	28	R	45 (8,8 %)
2	4		
4	9		
≥ 8	4		
Anfotericina B*			
≤ 0,25	209	S	506 (99,0 %)
0,5	225		
1	72		
2	2	R	5 (1,0 %)
8	1		
≥ 16	2		
Caspofungina			
≤ 0,12	376	S	512 (100 %)
≤ 0,25	123		
0,25	13		
Micafungina			
≤ 0,06	512	S	512 (100 %)
Flucitosina			
≤ 1	489	S	496 (96,9 %)
2	7		
16	1	I	1 (0,2 %)
≥ 64	15	R	15 (2,9 %)

*n= 511

No se obtuvo indicios de resistencia en ambas cepas de *C. dubliniensis*, presentaron CIM bajas de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ a fluconazol, $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$ a voriconazol y $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ a anfotericina B, por el método VITEK® 2. La CIM de *C. dubliniensis* se comprobó con el método de referencia de microdilución obteniéndose valores bajos de $0,02 \mu\text{g/mL}$ para el fluconazol, $0,25 \mu\text{g/mL}$ para voriconazol y $0,06 \mu\text{g/mL}$ para itraconazol.

4.6 Estudio Fenotípico convencional

Para complementar el estudio fenotípico, se realizó 6 pruebas a 58 cepas, 37 *C. albicans*, 2 *C. dubliniensis* y 19 *C. tropicalis*. Las pruebas realizadas consistieron en evaluar el crecimiento a alta temperatura y en medio hipersalino, así también, observar la formación de estructuras como tubos germinativos y clamidoconidios en agar leche, observar el aspecto de las colonias en agar semilla de girasol y en agar tabaco, y determinar la actividad esterasa. Las dos cepas de *C. dubliniensis* desarrollaron tubo germinativo al igual que los controles de *C. albicans*, también formaron clamidoconidios más abundantes que *C. albicans* (Figura 11).

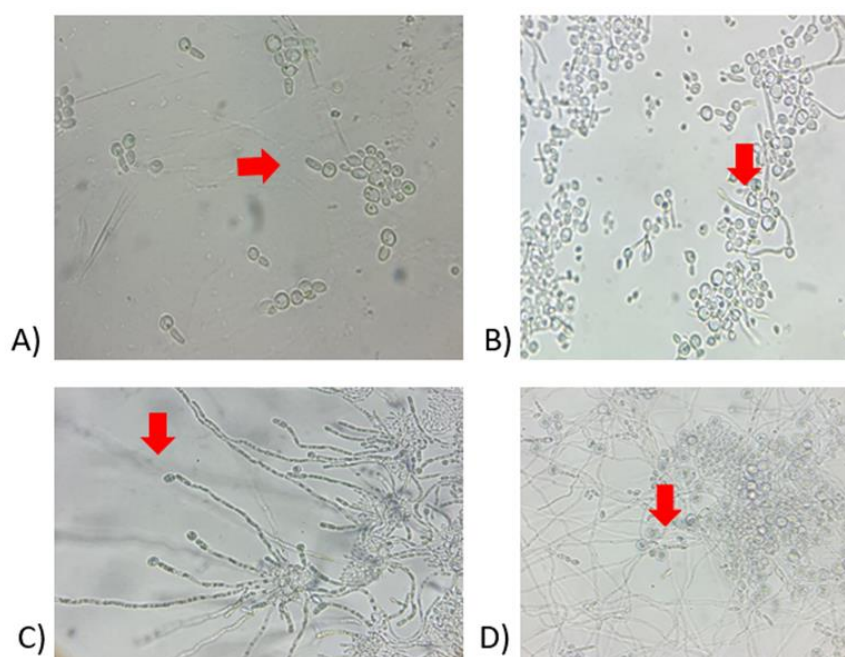


Figura 11. Formación de tubo germinativo y clamidosporas en agar leche.

Crecimiento en agar leche a 37°C . A y B) Luego de 2 h de incubación, presencia de tubo germinativo. C) Luego de 48 h a 28°C . Formación de clamidoconidias terminales en *C. albicans*. y D) abundantes clamidoconidias en *C. dubliniensis*.

La formación de clamidosporas o clamidioconidias por *C. dubliniensis* fue estimulada también en el medio agar girasol (Figura 12). Así también se pudo observar el desarrollo de colonias de aspecto seco y rugoso con bordes filamentosos en esta especie. En la placa cultivada con *C. albicans* no se evidenció la presencia de clamidosporas en el examen microscópico. Estas estructuras también pueden visualizarse a partir del crecimiento en medio agar tabaco.

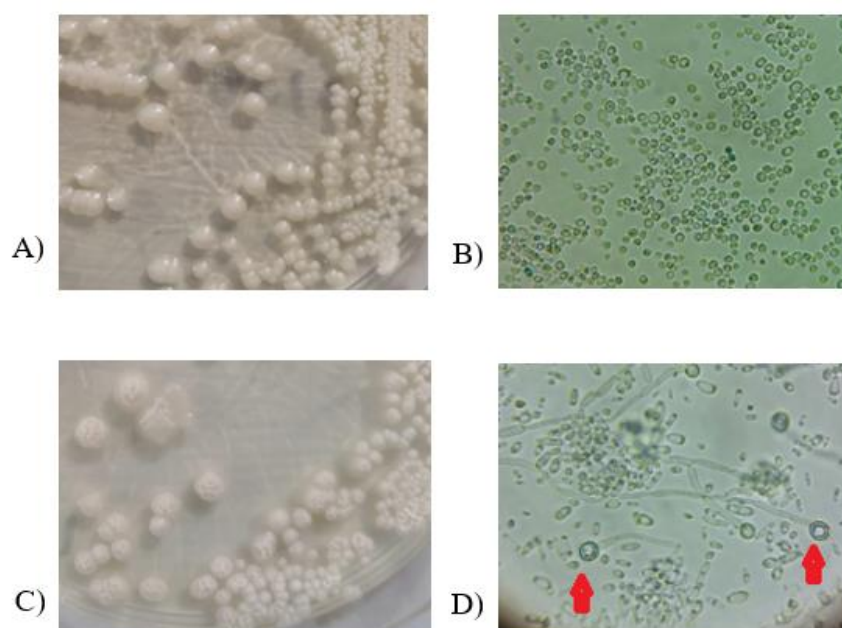


Figura 12. Crecimiento en agar semilla de girasol. Incubación a 28 °C 48-72 h. A) Desarrollo de colonias cremosas de *C. albicans* y B) ausencia de clamidosporas en examen microscópico directo a 400 X. C) Desarrollo de colonias rugosas de *C. dubliniensis* y D) presencia de clamidosporas en examen microscópico directo

Las dos cepas de *C. dubliniensis* aisladas en este estudio no crecieron a 42 °C y no se desarrollaron en medio hipersalino, en cambio se observó desarrollo de levaduras de *C. albicans* a esta temperatura y en medio hipersalino (Figura 13). Con respecto a las características macro-micromorfológicas de *C. dubliniensis* en medio de agar tabaco se observó colonias de aspecto ocre-rugosa y producción de clamidosporas, en cambio *C. albicans* desarrolló colonias más blancas y lisas sin producción de clamidosporas (Figura 14).

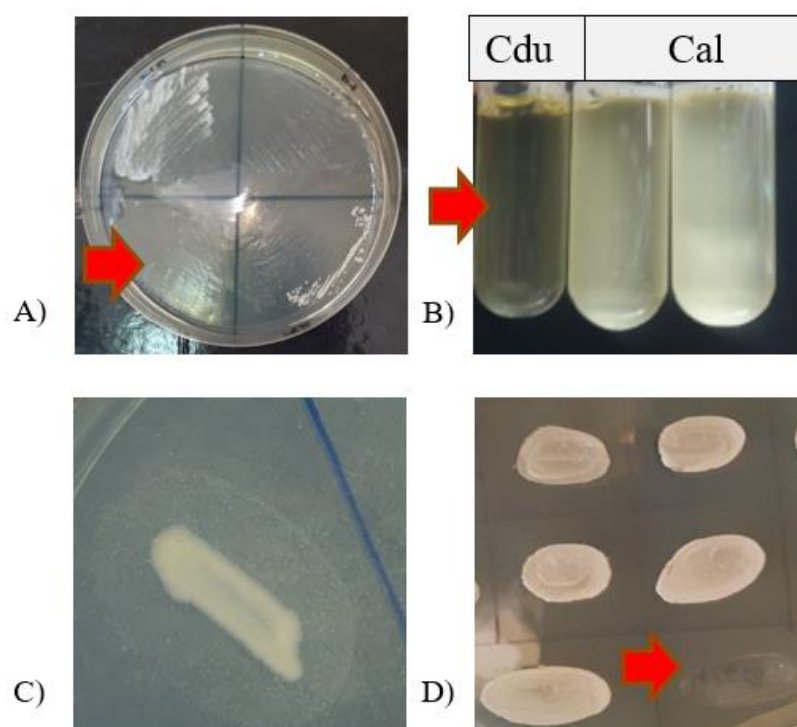


Figura 13. Prueba de termotolerancia, crecimiento en medio hipersalino y determinación de la actividad esterasa. A) Crecimiento en agar Sabouraud a 42° C luego de 72 h de incubación. Ausencia de desarrollo de *C. dubliniensis* (flecha roja) y desarrollo de colonias cremosas de *C. albicans*. B) Crecimiento en medio hipersalino NaCl 11 % a 37° C luego de 48 h de incubación. Ausencia de crecimiento de *C. dubliniensis* (flecha roja) y crecimiento de cepas de *C. albicans* C) Presencia de un halo de opacidad de *C. albicans* luego de la incubación a 28° C durante 72 h en medio Tween 80. D) Crecimiento en medio hipersalino NaCl 6,5 % a 37° C luego de 48 h de incubación. Ausencia de crecimiento de *C. dubliniensis* (flecha roja) y crecimiento de cepas de *C. albicans*.

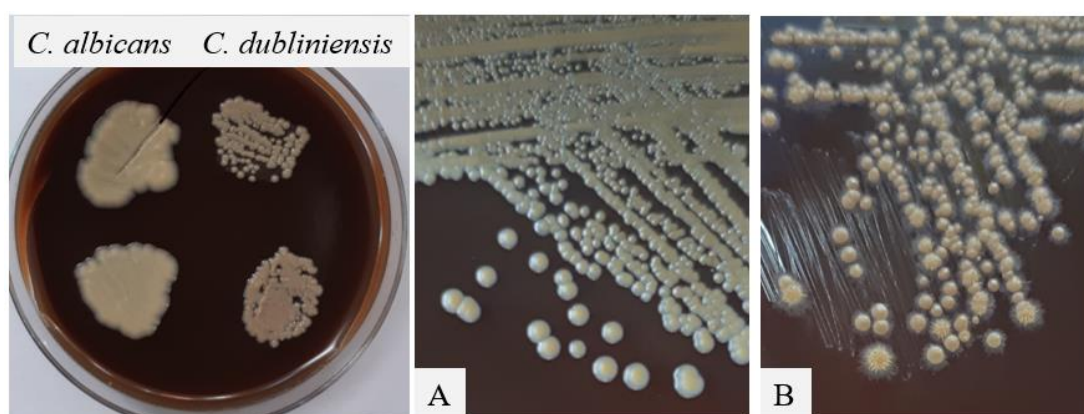


Figura 14. Desarrollo en agar tabaco. Crecimiento a 28° C luego de 48 h de incubación. Desarrollo de colonias blancas y lisas de *C. albicans* (A) y colonias de aspecto ocre y rugoso de *C. dubliniensis* (B).

En las tablas siguientes se observan el perfil fenotípico de 58 aislamientos, incluidos 37 cepas de *C. albicans*, 19 cepas de *C. tropicalis* y 2 de *C. dubliniensis*. En 28 aislamientos de *C. albicans* se pudo observar la repetición de 2 patrones de resultados de las pruebas ensayadas. Ambos aislamientos de *C. dubliniensis* presentaron el mismo comportamiento frente a las pruebas ensayadas (Tabla 19).

También se observó que las pruebas realizadas no son concluyentes para diferenciar *C. albicans* de *C. tropicalis* porque comparten ciertas características fenotípicas según se observa en la Tabla 20 y 21.

Tabla 19. Perfil fenotípico de *C. albicans* n= 28 y *C. dubliniensis* n= 2

Especie	CROM	42 °C	NaCl 6,5 %	OPA	Color en AT	Aspecto en AG	AL		Recuento
							TG	CL	
<i>Cal</i>	V	P	P	P	C	L	P	P	16
	V	P	P	P	C	L	P	N	12
<i>Cdu</i>	V	N	N	N	M	R	P	P	2

Cal: *C. albicans* *Cdu*: *C. dubliniensis* V: verde P: positivo N: negativo C: crema M: marrón R: rugoso L: liso
OPA: opacidad AT: agar tabaco AG: agar girasol AL: agar leche TG: tubo germinativo CL: clamidoconidios

Tabla 20. Perfil fenotípico de *C. albicans*. n= 37

CROM	42 °C	NaCl 6,5 %	OPA	Color en AT	Aspecto en AG	AL		Recuento
						TG	CL	
V	P	P	P	C	L	P	P	16
V	P	P	P	C	L	P	N	12
V	P	P	N	C	L	P	P	2
V	P	P	N	C	L	P	N	2
V	P	P	P	C	R	N	N	2
VC	P	P	P	C	L	P	P	1
VC	P	P	P	M	R	N	N	1
V	P	P	P	C	R	P	P	1

V: verde VC: verde claro P: positivo N: negativo C: crema M: marrón R: rugoso L: liso
OPA: opacidad AT: agar tabaco AG: agar girasol AL: agar leche TG: tubo germinativo CL: clamidoconidios

Tabla 21. Perfil fenotípico de *C. tropicalis*. n= 19

CROM	42 °C	NaCl 6,5 %	OPA	Color en AT	Aspecto en AG	AL		Recuento
						TG	CL	
VC	P	P	P	C	S	N	N	12
VC	P	P	P	M	S	N	N	3
VC	P	P	P	C	S	P	P	2
VC	P	P	P	C	S	N	P	1
VC	P	P	P	M	S	P	P	1

VC: verde claro P: positivo N: negativo C: crema S: seco
OPA: opacidad AT: agar tabaco AG: agar girasol AL: agar leche TG: tubo germinativo CL: clamidoconidios

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se reprodujo con éxito la reacción molecular para la diferenciación de las especies *C. albicans*/ *C. dubliniensis*, en la que se utilizó como blanco secuencias en las regiones ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosómico (84,88–90). Los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 presentan alta variabilidad, principalmente en la región intermedia del gen 5,8S, esto permite una discriminación a nivel interespecífica, lográndose diferenciar levaduras filogenéticamente cercanas (63).

Aunque varios métodos basados en PCR que utilizan ADNr como objetivo se han descrito anteriormente, implican dos reacciones de PCR separadas para cada cepa o manipulaciones adicionales (como la digestión de restricción para generar polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o Secuenciación de ADN) para la identificación específica de especies. Estos pasos adicionales se suman al costo de la prueba y / o consumir tiempo adicional por lo tanto retrasar los resultados.

En este sentido la aplicación de esta PCR dúplex brinda la identificación simultánea de ambas especies en una sola reacción, es específica y sensible. El método puede aplicarse directamente sobre aislamientos clínicos de levaduras y no requieren pruebas previas como la de formación de tubos germinativos; es adecuada para laboratorios con recursos limitados de microbiología equipados con tecnología de PCR básica.

El tiempo de procesamiento hasta la emisión de un resultado con esta metodología molecular, partiendo desde la extracción de ADN de cepas puras de levaduras, la PCR y la electroforesis realizada para la visualización del producto de PCR, se requiere un tiempo aproximado de 48 h para emitir la identificación final. Un tiempo prolongado con relación a la PCR en tiempo real. Otra limitación del método es que otras especies de *Candida* requerirán pruebas adicionales para su identificación específica de especie. El procesamiento de muestras con aislamientos múltiples requiere además un tiempo adicional pues se debe realizar la separación de una cepa pura.

Una limitación es que no se ensayó otras cepas de referencia de otras especies para determinar posibles reacciones de reacciones cruzadas de esta PCR. A pesar de que la longitud de la región ITS depende de la especie, es por ello que se utiliza para determinar variaciones intra e interespecíficas, según lo reportado en varios estudios (63,64). Otro aspecto para considerar es la gran dificultad para lograr una adecuada extracción del ADN de las levaduras debido a la fuerza y elasticidad de la pared celular, en este sentido para asegurarnos de la extracción adecuada, en este estudio se combinó un método físico con químico.

Con respecto a los individuos incluidos en el estudio, se superó el tamaño de muestra estimado, fue un grupo heterogéneo, que incluyó un grupo de inmunodeprimidos con VIH como así también otros pacientes aparentemente inmunocompetentes, de ambos sexos, la edad que presentaron incluye un rango muy amplio, desde menores a 1 año hasta 99 años, cabe resaltar un 26% de datos sin información con respecto a esta variable, lo que puede representar un sesgo en esta variable. Los aislamientos provinieron de diferentes materiales clínicos. En este estudio la frecuencia de *C. dubliniensis* fue menor (0,2 %) a lo reportado en otros estudios como; 6 % reportado por Mariel-Carballo, 2019, en cavidad oral de 145 pacientes inmunocomprometidos con VIH (40); 6,1 % reportado por Pineda *et al.*, 2008 de 212 aislamientos provenientes de diferentes materiales clínicos (87). Estos estudios concuerdan con la localización de esta levadura en cavidad oral como en este estudio donde ambos aislamientos provenían de la cavidad bucal, uno de un hisopado faríngeo de una paciente inmunocomprometida con VIH y otro de una muestra de dentina de una paciente aparentemente inmunocompetente. Ambos aislamientos provenían de pacientes ambulatorios, lo que sugiere que esta especie se encuentre como colonizante en estas muestras. No se conoce la implicancia real de *C. dubliniensis* en las infecciones orales, pues se lo ha encontrado en individuos sanos así como con candidiasis oral, se necesitan más estudios para poder establecer alguna asociación, debido a que los reportes hasta la fecha son inconsistentes entre sí, debido probablemente a la variación entre cepas, el número de aislados ensayados y los métodos empleados (90).

Las frecuencias reportadas de *C. dubliniensis* varían de un estudio a otro; posee diferentes prevalencias según la región geográfica (91), se reportan 4,6 % en Turquía (92), 5,4 % en Brasil (47), 6 % en México (40) y 20,2 % en Argentina (93); a diferencia de otras especies de *Candida*, *C. dubliniensis* no se ha aislado de muestras no humanas, esto ha llevado a especular que esta especie es exclusiva de humanos y los sitios más frecuentes donde se encuentra son la cavidad oral y el tracto respiratorio superior (36,38,94). Al-Sweih *et al.*, 2005 encontraron igual frecuencia de 0,2 % de *C. dubliniensis* en Kuwait con la diferencia de que en ese estudio se examinaron 1644 cepas de *Candida* con tubo germinativo positivo, dos provenían de muestras de orina y uno de un hisopo vaginal. Ninguno de los aislamientos de *C. dubliniensis* mostró resistencia frente a fluconazol, voriconazol y anfotericina B (95).

No se pudo establecer asociaciones entre la presencia de *C. dubliniensis* y las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes por la muy baja prevalencia. 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 (96). La identificación de las especies involucradas por origen de la muestra contribuye a optimizar el tratamiento. Se debe considerar la alta frecuencia de aislamientos de *Candida* en pacientes bajo tratamiento corticoideo y antibiótico e internados en la UCI (25). En todos los materiales clínicos se encontró mayor prevalencia de *C. albicans* en este estudio. En catéter, sangre y orina se reportan frecuencias relativas similares de *C. tropicalis* como segundo microorganismo más frecuente, cabe resaltar que estos materiales son normalmente estériles por lo que el aislamiento de levaduras puede considerarse significativo, esto difiere de lo publicado por Cornistein *et al.*, 2013; donde reporta casi igual frecuencia de *C. albicans* y *C. tropicalis* en catéter, sangre y orina (25).

Los medios con sustratos cromogénicos son de gran ayuda para la identificación presuntiva de distintas levaduras, a la vez que permiten reconocer la existencia de infecciones por más de una especie simultáneamente. Sin embargo, las colonias se presentan en una gama de color determinado y la caracterización del mismo depende del observador. Por este motivo no siempre es sencillo discriminar entre variaciones de tonalidades de un color para asignar solamente con esto la correspondencia con la especie aislada (87).

En los últimos años se ha promovido el uso de medios cromógenos como CHROMagar *Candida*. Este último es uno de los medios cromógenos más difundido; sin embargo, se informan datos variables sobre su sensibilidad y especificidad para clasificar diferentes especies del género. Para la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* se reporta 98 % de sensibilidad (8,79). Según Canizalez, 2013, la eficacia del agar cromogénico para identificar presuntivamente *C. albicans* demostró buen desempeño con una sensibilidad de 98,5 % y especificidad de 100 % (97). Aislamientos múltiples pueden ir asociados a recurrencia de la infección por falla terapéutica, para el diagnóstico correcto, el uso del medio cromogénico es muy útil. En este estudio se observó un buen desempeño de la especie *C. albicans* en el medio cromogénico ensayado (CONDA, pronadisa) con relación al control positivo para esa especie, al igual que describen otros autores sobre el desempeño de los medios cromogénicos para identificar presuntivamente *C. albicans* (84,87,98), cabe destacar que estos estudios utilizan otras marcas comerciales de medio cromogénico y que no se ha reportado el desempeño de esta marca en particular. A pesar de que en este estudio a las 72 h se observó una tonalidad más oscura para la especie *C. dubliniensis*, es muy difícil discriminar entre las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis* a partir de este medio ya que la observación es subjetiva, por lo que se requiere aplicar otras pruebas fenotípicas y estudios moleculares para confirmación.

Bajo las mismas condiciones, se ha observado un comportamiento inusual de las cepas de *C. tropicalis* que debieran presentar una coloración azul, según las especificaciones del fabricante, en cambio, en este medio se observó una coloración verdosa más clara que el control de *C. albicans*. Cabe resaltar que el medio se evaluó previamente con una cepa caracterizada como *C. tropicalis* por VITEK® 2 y Malditof.

Esto denota la importancia de validar previamente los medios a utilizar, ya que, en ocasiones como esta, puede observarse un desempeño del reactivo diferente a las especificaciones. Analizando que variables pudieron influir en este cambio, provenían del mismo lote, se mantuvieron las condiciones de pH y temperatura recomendadas para su uso, las cepas fueron aisladas a partir de una colonia por lo que se descarta alguna mezcla o contaminación para su interpretación, con respecto al operador en el 80 % de los casos lo preparó la misma persona, cambiando de operadores el resultado fue el mismo. Considerando la gran cantidad de cepas de *C. tropicalis* que desarrollaron esa tonalidad, hace suponer alguna falla relacionada al reactivo o al transporte del mismo desde su lugar de fabricación. Revisando la literatura, no se encontró publicaciones referentes a este medio y marca en particular para contrastar estos resultados. Debido a la baja frecuencia de *C. dubliniensis* en este estudio, es difícil establecer la sensibilidad y especificidad de las pruebas fenotípicas convencionales. Ninguna prueba resulta por sí sola 100 % sensible o específica por lo que Mariel- Carballo, 2019 recomienda la implementación de al menos 4 pruebas fenotípicas simultaneas como algoritmo de diagnóstico para la diferenciación de estas especies (40).

Se realizó algunas pruebas fenotípicas para caracterizar las especies del complejo *C. albicans*, tales como: desarrollo en agar girasol, crecimiento a 42 °C, desarrollo en agar tabaco y crecimiento en medio hipersalino con NaCl al 11 % y 6,5 %. Se inició con la búsqueda de estructuras como el tubo germinativo y producción de clamidoconidios en agar leche. Las dos cepas de *C. dubliniensis* desarrollaron tubo germinativo al igual que los controles de *C. albicans* que es un aspecto fenotípico que comparten (98,99). La formación de clamidosporas o clamidioconidias por *C. dubliniensis* fue estimulada también en el medio agar leche, aunque esta estructura también puede observarse en el medio semilla de girasol y agar tabaco. *C. dubliniensis* es capaz de producir abundantes clamidoconidios en relación con *C. albicans*. En el agar semilla de girasol presentó colonias de aspecto seco y rugoso con bordes filamentosos como se describe en otros estudios (40,96,98).

Las dos cepas de *C. dubliniensis* aisladas en este estudio no crecieron a 42 °C, en cambio se observó desarrollo de todas las levaduras de *C. albicans*, no obstante por razones aún no esclarecidas, se reportan fallos del crecimiento a 42 °C también para cepas de *C. albicans* (99). Con respecto al medio hipersalado con NaCl al 6,5 % y 11 %, los resultados fueron los esperados, porque no se obtuvo crecimiento de ninguna cepa identificada como *C. dubliniensis* en cambio los aislamientos de *C. albicans* experimentaron crecimiento. Esto concuerda con lo publicado por Mariel-Carballo et al., 2019, que obtuvieron resultados semejantes con NaCl a 11 %, y Camacho et al., 2012 con NaCl al 6,5 %; aunque también se reporta crecimiento escaso o negativo en este medio para *C. albicans* (40,96).

A pesar de que las pruebas fenotípicas con sus limitaciones son fáciles de realizar y de bajo costo, requiere de personal entrenado en la lectura e interpretación y se debe considerar el tiempo prolongado que se requiere para llevar a cabo toda una marcha analítica desde el aislamiento en medio cromogénico (48 h), reisolamiento en caso de mezclas (24 h), separación de cepa pura en medio sabouraud (24 h), pruebas fenotípicas varias (aproximadamente 72 h), lo que puede englobar un total de 7 días para la identificación final. Por el tiempo que implica y la baja especificidad de estas pruebas para aislamientos atípicos se sugiere el diagnóstico molecular o proteómico.

Un método comercial utilizado aquí para la determinación de la susceptibilidad a los antifúngicos y para caracterizar los aislamientos PCR negativos fue el sistema automatizado VITEK® 2, este método permite la identificación de las levaduras a nivel de especie y la determinación del patrón de susceptibilidad frente a los antifúngicos. Para la identificación utiliza pruebas bioquímicas fluorescentes, con resultados disponibles en aproximadamente 18 horas. Posee una base de datos de 53 especies y 14 géneros. Ha demostrado ser un instrumento confiable y efectivo, permitiendo una identificación precisa y rápida de varias especies de *Candida*, mejorando la calidad y la rentabilidad de la atención al paciente. La desventaja es que estos sistemas muchas veces no pueden diferenciar especies con perfiles bioquímicos similares, o algunas especies emergentes que no están incluidas en sus bases de datos (51,58).

C. albicans presentó elevada sensibilidad a los antifúngicos ensayados, mayor al 90 % en el caso de los azoles (fluconazol y voriconazol), mayor a 96 % en el caso de anfotericina B y flucitosina, 100 % para equinocandinas, que son antifúngicos no utilizados ampliamente o de primera línea. Así también, las dos cepas de *C. dubliniensis* presentaron muy buena sensibilidad, datos corroborados por el método de referencia de microdilución. Observando las distribuciones de CIM frente a los azoles por origen del aislamiento, se puede observar alta frecuencia de CIM bajas en prácticamente todas las muestras, en cambio en el caso de piel y anexos si bien el número de muestras es bajo, se aprecia valores más altos de CIM para fluconazol y más aún para voriconazol, frente al que se observa resistencia casi en la misma proporción que las cepas categorizadas como sensibles. La mayor frecuencia de resistencia encontrada fue para los azoles, 8,8 % y 4,4 % de cepas resistentes a voriconazol y fluconazol, respectivamente. Esto contrasta con lo publicado por Zuluaga *et al.*, 2010, donde la especie *C. albicans* presentó 4,8 % (7/140) SDD, 0 % resistente a FLU y 100 % sensible a VRC (100).

El surgimiento de aislamientos resistentes a los antifúngicos en el género *Candida* plantea la necesidad de identificar las levaduras y determinar la sensibilidad a drogas antifúngicas, especialmente en aquellos casos de fracasos terapéuticos (101). Se reporta que en la comunidad se encuentran cepas no silvestres de *Candida* spp. Esto puede estar relacionado al uso poco controlado de antifúngicos para tratar las candidiasis vulvo-vaginales en la comunidad. Dado que la mayoría de las infecciones invasoras son causadas por cepas de la microbiota endógena, debiera considerarse la inclusión de *Candida* spp. aisladas de pacientes ambulatorios en los estudios de vigilancia, especialmente en los centros de salud que atienden a este tipo de pacientes ya que estas cepas no silvestres portan algún mecanismo de resistencia (102).

En este estudio se observó elevada sensibilidad a anfotericina B (99 %). La mayor parte de las especies de hongos que causan infección en humanos son sensibles a la anfotericina B, por lo que este fármaco sigue teniendo el espectro de actividad más amplio. Como excepciones, algunas especies de *Candida* como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* o *C. tropicalis*, presentan resistencia clínica y/o valores elevados de la CIM frente a anfotericina B (67).

La PCR dúplex convencional aplicada en este trabajo para la identificación del complejo *C. albicans*, es una técnica muy útil para estudios de vigilancia de cepas emergentes, detecta dos especies en una sola reacción de PCR. Si bien esta técnica es más sensible y específica, para confirmar la identidad de estas levaduras, también requiere de un tiempo de procesamiento para el aislamiento del ADN ya que no se aplica directamente a muestras clínicas, existen otras técnicas de PCR más rápidas y aunque los insumos y reactivos podrían ser menos costosos para procesar la misma cantidad de muestras comparando con el sistema comercial VITEK® 2, requiere de infraestructura y varios equipamientos específicos no disponibles en un laboratorio de rutina, en ese sentido el sistema comercial VITEK® 2, a pesar de tener menor porcentaje de discriminación para la identificación de especies estrechamente relacionadas, cuenta con la ventaja de identificar una amplia variedad de especies contenidas en la base de datos, que podrían complementarse con algunas pruebas fenotípicas convencionales para la identificación rutinaria.

6. CONCLUSIÓN

Se estudió 1090 aislamientos provenientes de 896 pacientes, 83 % presentó un solo aislamiento, el resto de 2 a 8 aislamientos. Estos pacientes fueron 52 % (469/896) del sexo femenino, con mayor frecuencia de pacientes internados (66 %).

Se estandarizó con éxito la PCR dúplex convencional para la identificación molecular de *C. dubliniensis* y *C. albicans* en una sola reacción, técnica específica y sensible, con límite de detección de $10 \cdot 10^{-4}$ ng/ μ L.

Se diferenció molecularmente 0,2 % de *C. dubliniensis* y 77,6 % de *C. albicans* provenientes de 1090 aislamientos clínicos. La frecuencia de *C. dubliniensis* fue menor a lo reportado en otros estudios ya que solo se pudo identificar dos aislamientos. Ambos provenían de la cavidad oral de pacientes ambulatorios de sexo femenino, una con VIH y otra aparentemente inmunocompetente.

Hasta la fecha no existen publicaciones sobre esta especie en Paraguay, por tanto, el resultado de este estudio constituye uno de los primeros reportes de esta especie en nuestro país. Es importante realizar la vigilancia de cepas emergentes para conocer la implicancia clínica de estos aislamientos.

La frecuencia de *C. albicans* fue mayor en todos los materiales clínicos con relación a las otras especies. Si bien no se puede establecer la prevalencia en estos materiales ya que el muestreo selecciona sólo las cepas de coloración verde en el medio cromogénico que son presuntivas de *C. albicans*.

Se observó elevada sensibilidad de *C. albicans* a los antifúngicos ensayados (FLU, VRC, AB, CAS, MCF, FCT). En ambos aislamientos de *C. dubliniensis* se determinó una CIM baja al FLU, AB e ITRA. La vigilancia de la susceptibilidad antifúngica permitirá establecer esquemas terapéuticos más adecuados.

No se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas fenotípicas debido a la baja frecuencia de *C. dubliniensis*, si bien se reprodujo los resultados de otros trabajos, demostraron mejor desempeño las pruebas: desarrollo en agar girasol, crecimiento a 45 °C y actividad esterasa (medio opacidad), por lo que se sugiere el uso de al menos estas tres pruebas para la distinción presuntiva de este complejo.

No se pudo establecer asociaciones entre la presencia de *C. dubliniensis* y las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes por la muy baja frecuencia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaimes AA, Hernández FP, Herrera EM, Carreón AAR, Arenas RG. Portadores de Candida en la mucosa oral: tipificación de 35 cepas con CHROMagar Candida. Med Interna México. 2008;24(4):262-6.
2. Álvarez PS, González IL, Ojeda RM, Hoyos MP, Castro GY, Ramos NR. Colonización por Candida spp. en sujetos diabéticos y no diabéticos. Revista Cubana de Endocrinología. 2016;27(1):59-68.
3. Turner SA, Butler G. The Candida Pathogenic Species Complex. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. septiembre de 2014 [citado 24 de marzo de 2019];4(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143104/>
4. Alburquenque C, Tapia C. Interacción Candida albicans-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. Bol Micológico [Internet]. 1 de diciembre de 2013 [citado 5 de febrero de 2019];28(2). Disponible en: <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/875>
5. Laforet L. Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de Candida albicans [Internet] [Tesi Doctoral]. [Valencia, España]: Universitat de València; 2010. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/31891>
6. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 1 de enero de 2012;30(1):33-9.
7. Schoch C, Ciufu S, Domrachev M, Hotton C, Kannan N. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford) [Internet]. 2020;2020(baaa062). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
8. Muñoz V. Caracterización fenotípica y molecular de candida albicans y candida dubliniensis en muestras clínicas [Tesis de Grado]. [Valdivia, Chile]: Universidad Austral de Chile; 2012.
9. Bonifaz A. Micología médica básica. 4ta ed. México D.F: McGraw-Hill; 2012. 560 p.
10. Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of Candida albicans, C. glabrata, and C. parapsilosis complexes using one-step multiplex PCR. BMC Infect Dis. 25 de septiembre de 2018;18(1):480.

11. Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Nardin ME, Méndez E, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 1 de enero de 2016;48(1):43-9.
12. Sullivan DJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC, Westerneng TJ. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1 de julio de 1995;141(7):1507-21.
13. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. octubre de 2008;62(2):230-3.
14. Abastabar M, Shokohi T, Aghili S, Hedayati M, Haghani I. Hyphal wall protein 1 gene: A potential marker for the identification of different *Candida* species and phylogenetic analysis. *Curr Med Mycol*. 1 de diciembre de 2016;2(4):1-8.
15. Reséndiz J, Morales JJ. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Bol Méd Hosp Infant México*. abril de 2007;64(2):91-8.
16. Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek*. julio de 2014;106(1):67-84.
17. Berdugo C, Alejandra S. Caracterización fenotípica y molecular de *Candida africana* en una colección de aislamientos clínicos de origen Genito-Urinario de *Candida albicans*. 24 de mayo de 2017 [citado 5 de febrero de 2019]; Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/20401>
18. Gil M, González L, Mendoza V, Ochoa M, Castrülo S, Sánchez J, et al. Capability of biofilm formation in *Candida* genus species of clinical origin. *Rev Médica Risaralda*. diciembre de 2017;23(2):4-9.
19. Torres Guerrero E, Vásquez del Mercado E, Arenas R. Infecciones por *Candida* spp en un hospital de segundo nivel: datos clínico-epidemiológicos y tipificación. *Dermatol Cosmética Médica Quirúrgica*. 2014;12(1):18-23.
20. Enache-Angoulvant A. Reglas de interpretación de las infecciones por *Candida*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*. 2007;41(4):587-93.
21. Tobar A E, Silva O F, Olivares C R, Gaete G P, Luppi N M. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chil Infectol*. febrero de 2011;28(1):41-9.
22. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev Soc Venez Microbiol*. diciembre de 2001;21(2):38-45.

23. Pincay IP, Quinde CF, Villacreses WL, Rivadeneira MC. Especies de Cándidas como agentes causales de micosis vaginal en mujeres sexualmente activas. RECIMUNDO. 28 de marzo de 2018;2(1):283-301.
24. Zurita Macalupú S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. enero de 2018;35(1):126-31.
25. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 1 de junio de 2013;31(6):380-4.
26. Duarte A, Márquez A, Araujo C, Pérez C. Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal. Rev Soc Venez Microbiol. 2009;29(1):66-8.
27. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP de, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz. abril de 2003;98(3):401-5.
28. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz Méd Lima. enero de 2018;18(1):75-85.
29. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Rev Soc Venez Microbiol. 2005;25(1):103-17.
30. Mesa LM, Arcaya NM, Pineda S MR, Luengo HB, Calvo BM. Candidemia en el Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela 2000-2002. Rev Soc Venez Microbiol. febrero de 2005;25(2):109-13.
31. Sánchez M. Espectro clínico de la candidiasis invasora en el paciente crítico no neutropénico. Rev Iberoam Micol. 1 de marzo de 2006;23(1):8-11.
32. Zaragoza R, Pemán J. Invasive fungal infections in critically ill patients: different therapeutic options and a uniform strategy. Rev Iberoam Micol. junio de 2006;23(2):59-63.
33. Ahmed A, Azim A, Baronia AK, Marak KRSK, Gurjar M. Risk prediction for invasive candidiasis. Indian J Crit Care Med. 10 de enero de 2014;18(10):682.
34. Bedout C, Gómez BL. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. Infectio. diciembre de 2010;14:159-71.
35. Sandven P. Epidemiology of candidemia. Rev Iberoam Micol. 2000;17:73-81.
36. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Ten years on. FEMS Microbiol Lett. 1 de diciembre de 2005;253(1):9-17.

37. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. abril de 2000;38(4):1599-608.
38. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol*. mayo de 2003;41(5):1838-42.
39. Brown DM, Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Baqui AA, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV-seropositive pediatric dental patients. *Pediatr Dent*. junio de 2000;22(3):234-8.
40. Mariel-Carballo G. Phenotypic identification of *Candida dubliniensis* isolated from candidiasis of oral cavity in immunocompromised patients. *Dermatol Rev Mex*. 13 de febrero de 2019;63(1):14-25.
41. Mendoza M, Brito A, Díaz E, Ramos R. Especies de *Candida* en cavidad oral de niños desnutridos: A proposito de un caso con *Candida dubliniensis*. *Kasmera* [Internet]. 2006 [citado 29 de marzo de 2019];34(2). Disponible en: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/kasmera/article/view/4776>
42. Llanos González I, Montoya Ojeda R, Puello Hoyos M, Young Castro G, Correa Jiménez O, Suárez Álvarez P. Portación de *Candida* spp. en cavidad oral en diabéticos y no diabéticos. *Rev Cuba Endocrinol*. diciembre de 2017;28(3):1-11.
43. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol*. diciembre de 2008;23(6):505-9.
44. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalencia de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida africana* en mujeres gestantes con candidiasis vulvovaginal, en Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(2):72-6.
45. Matos BM de [UNESP. Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme [Internet]. 2009 [citado 2 de enero de 2020]. Disponible en: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/87935>
46. Mariano P de LS, Milan EP, Matta DA da, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. junio de 2003;98(4):533-8.
47. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE de, Gambale W, et al. MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Candida dubliniensis* ISOLATED FROM ORAL LESIONS OF HIV-POSITIVE AND HIV-NEGATIVE PATIENTS IN SÃO PAULO, BRAZIL. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. febrero de 2006;48(1):21-6.

48. Sharifynia S, Badali H, Sharifi Sorkherizi M, Shidfar MR, Hadian A, Shahrokhi S, et al. In Vitro Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida albicans* Complex Isolated from Patients with Respiratory Infections. *Acta Med Iran.* junio de 2016;54(6):376-81.
49. Hazirolan G, Altun HU, Gumral R, Gursoy NC, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. *J Mycol Medicales.* septiembre de 2017;27(3):376-81.
50. Al-Ahmad A, Auschill TM, Dakhel R, Wittmer A, Pelz K, Heumann C, et al. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in caries-free and caries-active children in relation to the oral microbiota-a clinical study. *Clin Oral Investig.* noviembre de 2016;20(8):1963-71.
51. Zuluaga A, Arango-Bustamante K, Caceres DH, Sánchez-Quitian ZA, Velásquez V, Gómez BL, et al. Concordance analysis between different methodologies used for identification of oral isolates of *Candida* species. *Colomb Médica CM.* 2018;49(3):193-200.
52. Ruiz-Aragón J, García-Martos P, Puerto JL, Marín P, Saldarreaga A, Moya P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagnóstico Biológico.* marzo de 2003;52(1):19-22.
53. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* abril de 1997;16(4):296-300.
54. Anane S, Kallel K, Kaouech E, Belhaj S, Chaker E. *Candida dubliniensis*: a novel emerging species. *Ann Biol Clin (Paris).* febrero de 2007;65(1):13-9.
55. Dolapci I, Tekeli A, Gocmen JS, Aysev D, Guriz H. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp. positive hemocultures. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* mayo de 2002;110(5):391-5.
56. Gamarra S, Mancilla E, Dudiuk C, Garcia-Effron G. *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* differentiation by colony morphotype in Sabouraud-triphenyltetrazolium agar. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(2):126-8.
57. Quesada C, Murillo L, Ureña M, Vargas E. CANDIDA DUBLINIENSIS: (Caracterización, diagnóstico, Importancia en pacientes Inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans*). *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTOAMERICA LXIV* (578) 43-48; 2007;LXIV:43-8.
58. Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A. Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(2):107-10.

59. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. J Clin Microbiol. febrero de 1998;36(2):329-34.
60. Nonaka CFW, Nascimento GJF, Goulart Filho JAV, Lima KC, Milan EP. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. Rev Odontol UNESP. 2008;37(2):125-32.
61. Bautista-Muñoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. J Clin Microbiol. enero de 2003;41(1):414-20.
62. Dalvand A, Katiraei F, Jafari Joozani R, Shokri H. Genotyping of *Candida albicans* isolated from animals using 25S ribosomal DNA and ALT repeats polymorphism in repetitive sequence. Curr Med Mycol. diciembre de 2018;4(4):12-9.
63. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol. 9 de julio de 2010;10(1):189.
64. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci. 17 de abril de 2012;109(16):6241-6.
65. Vásquez JA, Ramirez Castrillón M, Monsalve ZI. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. Rev Colomb Biotecnol. 2016;18(2):129-39.
66. Estrella MC. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. Rev Esp Quimioter. 2010;23(4):169-76.
67. Lumbreras C, Lizasoain M, María Aguado J. Antifúngicos de uso sistémico. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 1 de enero de 2003;21(7):366-80.
68. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Rev Iberoam Micol. marzo de 2006;23(1):39-49.
69. Quintero G, Hernando C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. Infectio. 1 de diciembre de 2010;14:172-80.
70. Rivas González AM, Cardona Castro NM. Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con qué opciones terapéuticas contamos? CES Med. 2009;23(1):61-76.
71. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J Basic Microbiol. 2002;42(3):207-27.

72. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2002;40(9):3135-9.
73. Castro Méndez C, García Sánchez E, Martín-Mazuelos E. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 1 de mayo de 2019;37:32-9.
74. Wayne P. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI supplement M60 [Internet]. Clinical Laboratory Standards Institute; 2017 [citado 16 de julio de 2019]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>
75. Wayne P. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th ed. CLSI standard M27 [Internet]. Clinical Laboratory Standards Institute; 2017 [citado 16 de julio de 2019]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>
76. Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infectol.* abril de 2009;26(2):144-50.
77. Kaur R, Dhakad MS, Goyal R, Haque A, Mukhopadhyay G. Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species: A Comparison of Vitek-2 System with Conventional and Molecular Methods. *J Glob Infect Dis.* diciembre de 2016;8(4):139-46.
78. Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R. Evaluación de las tarjetas AST-YSO1 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 1 de abril de 2014;46(2):111-8.
79. Sanabria R, Samudio M, Fariña N, Laspina F, Ortellado de Canese J, Arbizu Ledesma G, et al. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados, e inmunocomprometidos en Paraguay. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* diciembre de 2006;4(2):45-9.
80. Sanabria RR, Samudio M, Fariña N, Laspina F, Figueredo L de, Aguilar G, et al. Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. *Mem Inst Investig En Cienc Salud* [Internet]. 18 de noviembre de 2014 [citado 2 de abril de 2019];12(1). Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/33>

81. Aguilar G, Araujo P, Godoy E, Falcón M, Centurión MG, Ortiz R, et al. Identificación y características de *Candida* spp. en secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas. Mem Inst Investig En Cienc Salud [Internet]. 15 de enero de 2018 [citado 12 de diciembre de 2019];15(3). Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/1262>
82. Aguilar G, Araujo P, Lird G, Insaurrealde S, Kawabata A, Ayala E, et al. Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida* spp. aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay. Rev Panam Salud Pública [Internet]. 23 de septiembre de 2020 [citado 11 de marzo de 2021];44. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7498287/>
83. Condalab. Agar Cromogénico *Cándida* [Internet]. Condalab. 2019. Disponible en: <https://www.conditional.com/int/es/medios-de-cultivo-para-diagnostico/1129-9205-agar-cromogenico-candida.html>
84. Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel AM, Chandy RM. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. BMC Infect Dis. 2012;12:230.
85. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol [Internet]. Promega. 2019 [citado 16 de julio de 2019]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
86. Giusiano G, Piontelli E. Hongos oportunistas levaduriformes y filamentosos comunes en clínica. 1a ed. 2016. 244 p.
87. 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. diciembre de 2008;40(4):211-7.
88. McCullough MJ, Hepworth G, Gordon I, Clemons KV, Stevens DA. Molecular epidemiology of global *Candida dubliniensis* isolates utilizing genomic-wide, co-dominant, PCR-based markers for strain delineation. Med Mycol. diciembre de 2009;47(8):789-95.
89. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol. agosto de 2000;38(8):3016-21.
90. Tantivitayakul P, Panpradit N, Maudcheingka T, Klaophimai A, Lapirattanakul J. Genotyping of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S rDNA analysis shows association with virulence attributes in oral candidiasis. Arch Oral Biol. enero de 2019;97:18-24.

91. Pontón J, Rùchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al. Emerging pathogens. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:225-36.
92. Satana D, Genc GE, Erturan Z. The antifungal susceptibilities of oral *Candida* spp isolates from HIV-infected patients. *Afr J Microbiol Res.* 18 de marzo de 2010;4(6):466-70.
93. Luque AG, Biasoli MS, Tosello ME, Binolfi A, Lupo S, Magaró HM. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses.* enero de 2009;52(1):53-9.
94. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. - PubMed - NCBI. abril de 2000;38(4):1599-608.
95. Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S, Chandy R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses.* 2005;48(5):347-51.
96. Camacho L D, Mata E S, Pardi G, Pineda V, Roselló A, Collela MT. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. *Kasmera.* 2012;40(1):47-58.
97. Canizalez A. Eficacia de un agar cromogénico para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *PEDIATRÍA MÉXICO.* 1 de julio de 2013;16:10-5.
98. Albaina O, Sahand IH, Brusca MI, Sullivan DJ, Fernandez de Larrinoa I, Moragues MD. Identification and characterization of nine atypical *Candida dubliniensis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* 1 de febrero de 2015;64(Pt_2):147-56.
99. Perurena Lancha MR, Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Mendoza Llanes D, Valdés Ramos EA. *Candida dubliniensis*: necesidad de establecer un diagnóstico correcto. *Rev Cubana Med Trop.* diciembre de 2006;58(3):0-0.
100. Zuluaga Rodríguez A, de Bedout Gómez C, Agudelo Restrepo CA, Hurtado Parra H, Arango Arteaga M, Restrepo Moreno Á, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). *Rev Iberoam Micol.* 1 de julio de 2010;27(3):125-9.
101. Duque C, Uribe O, Soto A, Alarcón J. Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de Medellín. *Infectio.* 1 de marzo de 2009;13:14-20.
102. Alburquenque C, Beltrán S, Olivares R, Falconer MA, Amaro J, Fuentes M, et al. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Rev Chil Infectol.* junio de 2013;30(3):244-51.

8. ANEXOS

ANEXO A. Aceptación de Protocolo de Tesis 2019

 **Universidad Nacional de Asunción**
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : CAROLINA PAOLA DURÉ PAREDES
C.C. : MARGARITA SAMUDIO, NORMA FARIÑA, FLORENTINA LASPINA, SONIA
ABENTE, YOLANDA LÓPEZ.
Código : P19/2019
Fecha : 12/08/2019

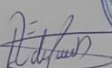
Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

"DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR Y PERFIL DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE *CANDIDA ALBICANS* Y *CANDIDA DUBLINIENSIS* AISLADAS DE PACIENTES AMBULATORIOS Y HOSPITALIZADOS".

Ha sido aceptado



COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez
Coordinadora



COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Ramona Florencia del Puerto
Coordinadora Interina

Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA

ANEXO B. Conformidad de la Jefa del Departamento Microbiología – IICS.



**CONSEJO NACIONAL
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**


PROCIENCIA
PROMOVIMOS LA INNOVACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA




San Lorenzo, 7 de febrero 2019

Señores:

Comité de Admisión
Maestría en Ciencias Biomédicas
FCQ-IICS-UNA

Me dirijo a Ustedes, y por su intermedio al Comité Académico del Programa en Ciencias Biomédicas del IICS-FCQ UNA con el fin de expresar cuanto sigue:

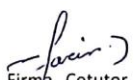
El Departamento de Microbiología acepta la postulación de Carolina Paola Duré Paredes, con cédula de identidad N° 4004594 como estudiante del programa de Maestría en Ciencias Biomédicas con el compromiso de desarrollar la Tesis de Maestría en el Tema: "Diferenciación fenotípica y molecular de *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes con candidiasis oral", en la Línea de Investigación "Análisis Microbiológico y molecular de hongos clínicamente significativos" bajo la tutoría de Dra Margarita Samudio y la cotutoría de la Dra Norma Fariña.

Por este medio dejamos constancia que el desarrollo del proyecto de investigación citado, cuenta con el visto bueno del jefe del departamento y que no conllevará al desembolso de recursos financieros extraordinarios o que excedan la programación presupuestaria previamente asignada al departamento.

Por todo lo expuesto anteriormente, expresamos nuestro apoyo a la postulación a la maestría de la estudiante Carolina P. Duré Paredes.

Atentamente,


 Firma Tutor
Margarita Samudio


 Firma Cotutor
 Dra. Norma Fariña González
 Reg. Prof. N° 461


 Vo. Bo. Jefe Dpto.
 Dra. Floriana Laguarda E.
 Reg. Prof. N° 303

ANEXO C. Aceptación de Protocolo del Proyecto CONACYT PINV15- 919



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTIFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : NORMA FARIÑA
C.C. : SAMUDIO M., LASPINA F, ABENTE S, LOPEZ Y.
Código : P24/2015
Fecha : 10/09/2015

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“Diferenciación fenotípica, molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados de Paraguay”.

Ha sido aceptado



COMITÉ CIENTIFICO (CC)
Dra. Soledad Campos
Coordinadora





COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora



Recibido
10/09/2015

Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA

ANEXO D. Ficha Clínica del Proyecto CONACYT PINV15- 919

Ficha Clínica			
Proyecto: Diferenciación fenotípica y molecular de <i>Candida dubliniensis</i> aisladas de pacientes con candidiasis			
Datos del paciente			
Nombre y Apellido:.....		Código:.....	
Sexo	☐ F ☐ M	Edad	años
		Procedencia:.....	
		Profesión:.....	
☐ Internado		☐ Urgencia	
Fecha de ingreso __/__/__		Fecha de egreso __/__/__	
Datos Clínicos			
Origen de la muestra	☐ Secreción orofaríngea ☐ Muestra de paladar ☐ Prótesis dental ☐ Dorso de lengua ☐ Otro Especificar.....		
Tipo de lesión	☐ eritematosa	☐ pseudomembranosa	☐ Otro.....
Tratamiento antifúngico previo	☐ NO ☐ SI	Fecha __/__/__ Duración días	
☐ Fluconazol	☐ Anfotericina B	☐ Voriconazol	☐ Otro.....
Estadío CD4 (Cel/uL)	☐ menor a 200	☐ 200 a 500	☐ mayor a 500
Tratamiento instaurado	Fecha __/__/__		Duración días
☐ Fluconazol	☐ Anfotericina B	☐ Voriconazol	☐ Otro.....
Evolución: Mejorado ☐ SI ☐ NO			

ANEXO E. Especificaciones del Agar Cromogénico Cándida (CONDA® pronadisa, España)



pronadisa
Micro & Molecular Biology

CANDIDA CHROMOGENIC AGAR

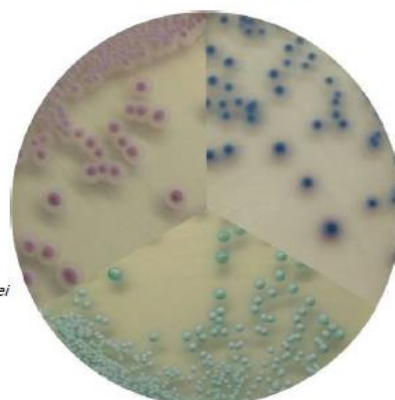
CAT N°: 1382

Differential and selective chromogenic medium for the isolation and quick identification of *Candida spp* of clinical importance

FORMULA IN g/l

Glucose	20.00	Chromogenic Mixture	0.40
Peptone	10.00	Bacteriological Agar	15.00
Chloramphenicol	0.50		

Final pH 6.1 ± 0.2 at 25°C



Candida krusei
ATCC 34135

Candida tropicalis
ATCC 1369

Candida albicans
ATCC 10231

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Beige claro	Ámbar claro, ligeramente opalescente	6,1±0,2

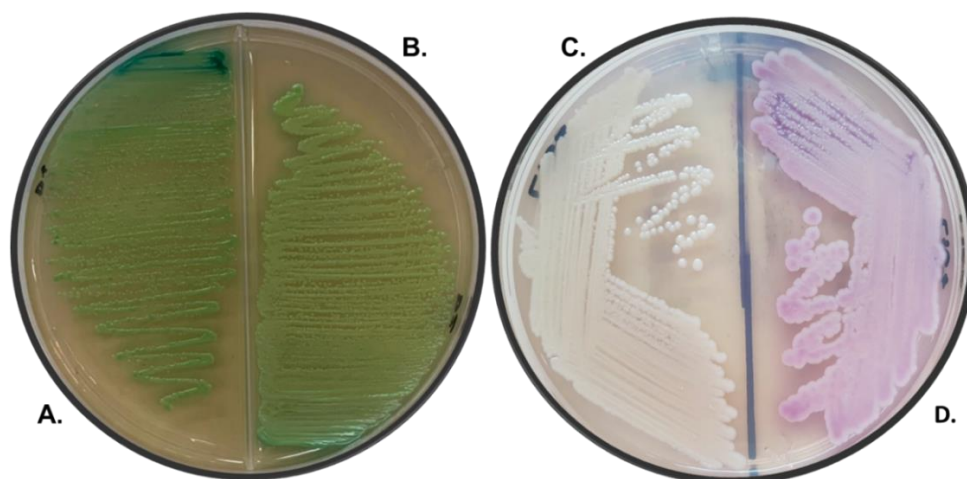
Test microbiológico

Condiciones de incubación: (35-37 °C / 24-48-72 h).

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Buen crecimiento	Colonia verde
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Buen crecimiento	Colonia azul
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	Buen crecimiento	Colonia blanco claro-morado
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Buen crecimiento	Colonia morada-rosa

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

ANEXO F. Control de calidad de los medios utilizados

Colonias de *Candida* en Agar Cromogénico Candida (CONDA®) durante 48 h a 35 °C. (A) *C. dubliniensis*: colonias cremosas de color verde. (B) *C. albicans* ATCC 90028: colonias cremosas de color verde. (C) *C. parapsilosis* ATCC 22019: colonias cremosas de color blanco-púrpura. (D) *C. krusei* ATCC 6258: colonias secas de color rosado-púrpura.

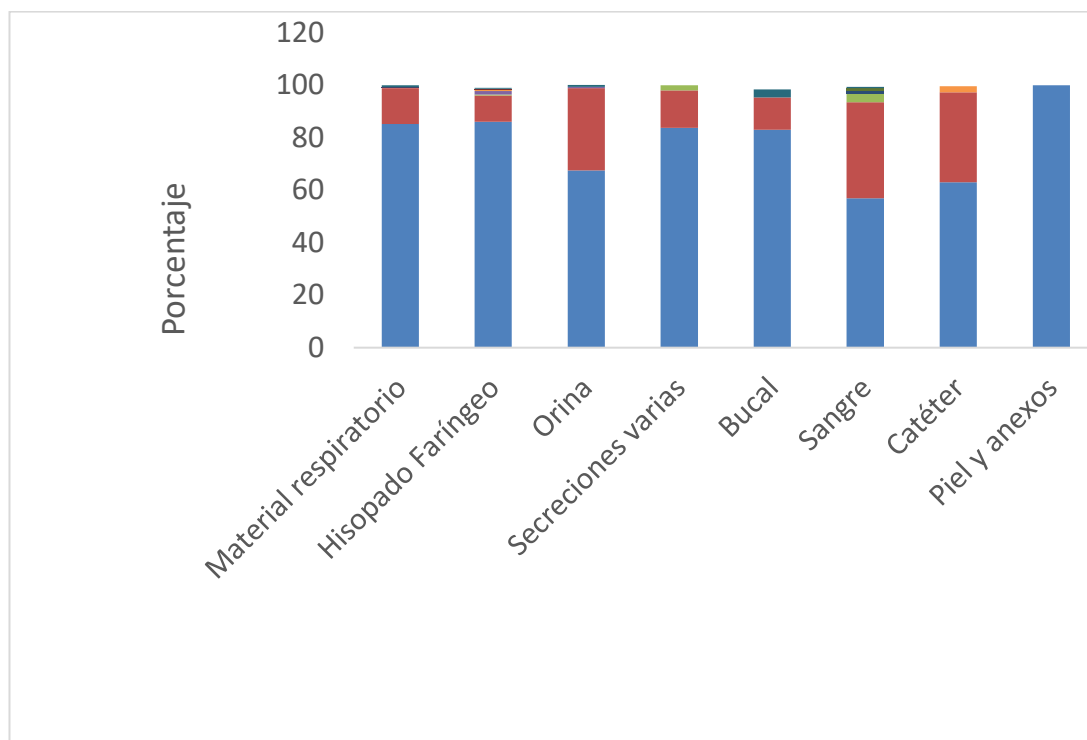
ANEXO G. Distribución de CIM a azoles según el origen de los aislamientos de *C. albicans*. n= 512

		Origen de los aislamientos								Total
		Bucal ^a	Catéter	Hisopado faringeo	Material respiratorio ^b	Orina	Piel y anexos	Sangre	Secreciones varias ^c	
CIM FLU										
S	≤ 0,5	25 (89,2)	12 (100)	153 (82,2)	41 (37,6)	56 (55)	6 (42,9)	26 (72,2)	22 (88)	341
	≤ 1	1 (3,6)		13 (7)	57 (52,3)	23 (22,5)		5 (13,9)		99 (19,3)
	1	1 (3,6)		10 (5,4)		8 (7,8)	2 (14,3)	3 (8,3)	1 (4)	25 (4,9)
	2	1 (3,6)		3 (1,6)	3 (2,8)	6 (5,9)	1 (7,1)	1 (2,8)		15 (2,9)
	4			2 (1,1)	1 (0,9)	2 (2)	3 (21,4)	1 (2,8)		9 (1,8)
R	8			2 (1,1)	4 (3,7)	3 (2,9)	2 (14,3)		2 (8)	13 (2,5)
	16			2 (1,1)	2 (1,8)	4 (3,9)				8 (1,6)
	32			1 (0,5)	1 (0,9)					2 (0,4)
Sub total		28	12	186	109	102	14	36	25	
CIM VOR										
S	≤ 0,12	27 (96,4)	11 (91,6)	168 (45,3)	95 (87,1)	86 (84,3)	7 (50)	31 (86,1)	23 (92)	448
SDD	0,25		1 (8,3)	3 (1,6)	2 (1,8)	4 (3,9)	1 (7,1)	3 (8,3)		14 (2,7)
	0,5				2 (1,8)	2 (2)				4 (0,8)
R	1			7 (3,8)	8 (7,3)	5 (4,9)	6 (42,9)	1 (2,8)	1 (4)	28 (5,5)
	2			3 (1,6)				1 (2,8)		4 (0,8)
	4			5 (2,7)		3 (2,9)			1 (4)	9 (1,8)
	≥ 8	1 (3,6)			1 (0,9)	2 (2)				4 (0,8)
Sub total		28	12	186	108	102	14	36	25	512 (100)

^adentina, placa, hisopado dientes; ^besputo, secreción traqueal, BAL; ^cabscesos, secreciones genitales

ANEXO H. Distribución porcentual de especies según el origen del aislamiento.

n= 1090



■ <i>Candida no albicans/dubliniensis</i>	■ <i>C. dubliniensis</i>
■ <i>Kodamaea ohmeri</i>	■ <i>C. lusitaniae</i>
■ <i>C. famata</i>	■ <i>C. parapsilosis</i>
■ <i>C. zeylanoides</i>	■ <i>C. tropicalis</i>
■ <i>C. rugosa</i>	■ <i>C. albicans</i>
■ <i>C. intermedia</i>	