

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCION FÚNGICA POR LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*: *Candida dubliniensis*

Carmen Castro Méndez y Estrella Martín Mazuelos

Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el aumento de pacientes inmunodeprimidos, uso generalizado de antimicrobianos, utilización de inmunosupresores, maniobras diagnósticas invasivas, e implantación de alimentación parenteral. Estos nuevos tratamientos y técnicas diagnósticas presentan, como efectos colaterales, la infección oportunista.

La gran mayoría de las infecciones fúngicas están producidas por *Candida albicans* (más del 50%), aunque hay que destacar el aislamiento, con una frecuencia cada vez más elevada, de otras especies como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida zeylanoides* y *Candida dubliniensis*. Las levaduras del género *Candida* pueden causar un gran número de cuadros clínicos, con manifestaciones variadas que dependen del lugar de la infección y del tipo de paciente. Diferenciar entre colonización e infección es un punto clave a la hora de realizar el diagnóstico microbiológico a partir de las distintas muestras clínicas.

En la actualidad, debido al diferente patrón y grado de sensibilidad de las distintas especies de *Candida*, y al aumento que se ha registrado del índice de resistencias a los antifúngicos, es aconsejable la identificación de especie en las levaduras aisladas de muestras clínicas. Por todo lo explicado, en la siguiente revisión evaluamos los distintos métodos de diagnóstico microbiológico que tenemos a nuestra disposición.

GÉNERO *Candida*

El género *Candida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae* dentro del orden *Deuteromycota* (hongos imperfectos), compuesto por más de 200 especies diferentes y con hábitat natural ubicuo. Muchas de estas especies forman parte de nuestra flora normal de la piel, tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio; aproximadamente un 10% de éstas se relaciona con enfermedades infecciosas. Debido a su amplia distribución, puede originar infecciones de distinta localización y gravedad, generalmente asociadas a factores predisponentes del huésped, por lo que se le considera como un microorganismo patógeno oportunista. Hemos de destacar la importancia de la infección de origen endógeno frente a la infección exógena, jugando un papel fundamental para su desarrollo la colonización previa de distintas localizaciones en el paciente.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la candidiasis superficial, estomatitis crónica, candidiasis mucocutánea, vulvovaginitis y, en ocasiones, cuadros más graves con manifestaciones invasoras en el paciente crítico o inmunodeprimido, incluyendo entidades como la candidiasis diseminada, candidemia, endoftalmítis y peritonitis. El diagnóstico etiológico de estas infecciones, desde el punto de vista clínico, es muy difícil, debido fundamentalmente a la ausencia de síntomas característicos. Por ello hay que recurrir al diagnóstico microbiológico.

Resumiendo lo anterior, el papel del laboratorio de microbiología es de gran importancia, siendo la identificación de especie algo fundamental para la elección de un tratamiento adecuado. Los métodos de diagnóstico microbiológico los podemos clasificar de la siguiente manera: 1) observación microscópica, 2) métodos basados en el cultivo, y 3) métodos independientes del cultivo: a) detección de antígeno o anticuerpos, b) detección de metabolitos, y c) detección de otros componentes estructurales.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

La observación microscópica directa de toda muestra remitida para su estudio micológico es una técnica sencilla y recomendable, ya que permite el diagnóstico presuntivo en muchas ocasiones. El mayor tamaño de las células fúngicas permite, a diferencia de las bacterias, su observación a bajos aumentos en las muestras sin fijar, realizándose así un diagnóstico presuntivo del agente etiológico. Siempre que sea posible, realizaremos la observación en fresco ayudándonos de los siguientes reactivos:

- Examen en fresco con KOH (10-30%): facilita la observación ya que el KOH presenta efector clarificador, disolviendo los distintos elementos celulares y permaneciendo intacta la pared celular fúngica.
- Blanco de calcofluor: se une específicamente a la quitina de las células fúngicas y emite una fluorescencia que delimita a los elementos fúngicos. Al microscopio de fluorescencia *C. albicans* y demás especies muestran una fluorescencia verde brillante; *C. glabrata* emite una fluorescencia más débil.

Por otra parte, aunque las levaduras se tiñen bien con la mayoría de los colorantes bacterianos (tinción de Gram), también disponemos de tinciones histológicas específicas como la de plata-metenamina y la del ácido periódico de Schiff (PAS), que nos permiten su visión bien diferenciada. La ventaja más destacable de las tinciones es que se trata de procedimientos rápidos, fiables y de bajo coste, siendo de gran utilidad, porque permite diferenciar algunos hongos por su morfología, así como evidenciar la reacción tisular y la invasión de tejidos propios de la infección, disminuyendo así el tiempo requerido para el diagnóstico. Como inconvenientes, cabe destacar la existencia de falsos positivos y negativos, la sensibilidad variable, dependiendo del microscopista y del tipo de muestra, y el hecho de tener que partir de muestras invasoras en muchas situaciones clínicas, lo que puede estar contraindicado en el paciente inmunodeprimido.

MÉTODOS BASADOS EN EL CULTIVO

El cultivo es fundamental para establecer la etiología y efectuar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, así como para realizar estudios de tipificación molecular.

Identificación mediante criterios morfológicos

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen en el laboratorio con gran facilidad en un gran número de medios de cultivo convencionales. El medio glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibiótico añadido (Mycobiotic®), es el más indicado para realizar el aislamiento y para una posterior identificación. La incubación se realiza a temperatura ambiente cuando se trata de medios con inhibidores, y a 37°C en el caso de medios enriquecidos. Al cabo de las 24-48 h se pueden observar las colonias características de color blanco o crema, de consistencia opaca, elevadas, lisas, brillantes o mates, y con un diámetro de 1 a 3 mm. El aspecto de la colonia tiene gran interés, ya que es característica de cada especie en los distintos medios y a partir del color, olor y consistencia nos facilitará su posterior identificación.

El estudio microscópico de los organismos a partir del cultivo se puede realizar mediante examen en fresco o tinciones. La observación microscópica evidencia la existencia de blastoconidias, pseudohifas, clamidosporas, etc., con un tamaño y forma característica a partir de cultivo en distintos medios. La presencia de hifas verdaderas y clamidosporas obtenidas en distintos medios (medio de agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria) es característica y de utilidad para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

La producción de tubo germinativo es una prueba muy rentable para identificar la especie (*C. albicans* y *C. dubliniensis*), siendo además una prueba sencilla y rápida, con el inconveniente que pueden ser confundidos los tubos germinativos con hifas, necesitando experiencia previa para su interpretación. Antes de emitir un resultado negativo se debe tener presente la existencia de, aproximadamente, un 5% de cepas de *C. albicans* que no producen tubo germinal, y también la posibilidad de falsos positivos en el caso de *C. tropicalis*. La producción de clamidosporas en los medios antes señalados es más rentable para la confirmación de *C. albicans* cuando la prueba del tubo germinativo es negativa.

Identificación mediante criterios bioquímicos basados en sistemas enzimáticos

a) **Medios de cultivo cromogénicos:** se trata de medios diseñados para aislar e identificar simultáneamente especies del género *Candida*, tras 24-48 h de incubación a 35-37°C. El fundamento es la capacidad de hidrolizar sustratos cromogénicos en presencia de un indicador. Los distintos medios comercializados son:

- CHROMagar *Candida*® (CHROMagar): la siembra se realiza según técnicas convencionales y se incuba a 30-37°C durante 48 h para que las levaduras desarrollen el color que las caracteriza (tabla 1).

Tabla 1. Diferenciación de las colonias de *Candida* en CHROMagar.

Especie	Característica de la colonia	Color
<i>C. albicans</i>	Lisa, crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. dubliniensis</i>	Lisa, no crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. tropicalis</i>	Lisa	Azul oscuro con halo marrón
<i>C. krusei</i>	Rugosa	Rosa con halo blanco
<i>C. glabrata</i>	Brillante y cremosa	Violeta

- *Candida* ID® (bioMérieux): permite identificar *C. albicans* y orienta en el caso de otras especies. El tiempo y la temperatura de incubación son similares a los descritos anteriormente y la colonia de *C. albicans* aparece redonda, convexa y de color azul.
- Albicans ID2® (bioMérieux): medio muy similar a *Candida* ID®, aporta como avance la identificación de *C. tropicalis* que aparece de color rosa (tabla 2).

Tabla 2. Color de colonias en Albicans ID2®.

Especie	Color de la colonia
<i>C. tropicalis</i>	Rosa
<i>C. lusitanae</i>	
<i>C. guilliermondii</i>	
<i>C. kefyr</i>	
<i>C. famata</i>	Rosa menos intenso
<i>C. humicola</i>	

- Cromogen Albicans® (Biomedics): es un medio selectivo y diferencial utilizado para la identificación de *C. albicans*. Las placas se incuban a 30-37°C durante 24-48 h obteniéndose colonias redondeadas, lisas y de color azul-verdoso.
 - CandiSelect® (BioRad): medio selectivo que permite la identificación de *C. albicans* (colonias lisas azules). *Candida tropicalis* y el género *Trichosporon* pueden desarrollar un color similar a *C. albicans*, pero con una morfología muy diferente.
- b) **Medios fluorogénicos:** facilitan la identificación de *C. albicans* en los cultivos primarios:
- Fluroplate Candida® (Merck): identifica a *C. albicans* por la capacidad de hidrolizar un sustrato mediante la enzima N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa), generando un metabolito fluorescente. El tiempo de incubación es de 18-24 h a 30-37°C.
 - Agar SDCA-MUAG® (Biolife): medio y técnica muy similares a los anteriores, pero en este caso actúa sobre otro sustrato, la 4-metilumbiferil-2-acetamida-2-desoxi-β-D-galactosamina, produciendo también un metabolito fluorescente.
- c) **Sistemas enzimáticos** para la identificación de *C. albicans* a partir de las colonias aisladas en medios convencionales. Detectan dos enzimas que sólo están presentes en *C. albicans*: β-galactosaminidasa (MUGAL) y L-prolina aminopeptidasa (PRO). El sistema se ayuda de sustratos fluorogénicos o cromogénicos. Para la lectura del metabolito fluorescente necesitamos la utilización de la lámpara de luz UV de 365 nm .

Tabla 3. Identificación presuntiva de *C. albicans* por detección enzimática.

Enzimas MUGAL y PRO		Sólo MUGAL
Sustrato fluorogénico	Sustrato cromogénico	Fluorogénico
BactiCard Candida® (Remel)	<i>Candida albicans</i> Screen® (Remel)	MUAG Test® (Biolife)
Albistrip® (Lab M. Ltd)	<i>Candida albicans</i> CA 50® (Murex)	
RapID Albicans® (Biolife)		
Albicans-Sure® (Clinical Standards)		

- d) **Sistemas inmunológicos** de aglutinación con partículas de látex de identificación para *C. albicans*: Bichro Látex Albicans® (Fumouze).
- e) **Otros sistemas** que permiten la identificación de otras especies distintas a *C. albicans*:
- Glabrata RTT® (Fumouze): se basa en la utilización de trehalosa y maltosa que, en caso positivo, conduce a la producción de glucosa que se detecta por una reacción de oxidación; identifica *C. glabrata*.
 - Bichrolate krusei® (Fumouze): identifica *C. krusei* mediante aglutinación con partículas de látex.
 - Bichro-dubli® (Fumouze): detecta por medio de una reacción de aglutinación la presencia de *C. dubliniensis*.

Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas

El auxonograma convencional aplica por separado diferentes nutrientes sobre un medio sintético para apreciar el crecimiento de la levadura en estudio. Observaremos la utilización de los distintos nutrientes, ya sean hidratos de carbono (azúcares y alcoholes) o compuestos nitrogenados (peptona, asparagina, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio), y a partir del requerimiento nutricional realizaremos la identificación. Se trata de un método poco utilizado en la actualidad, debido fundamentalmente a la laboriosidad que supone su

realización en un laboratorio de Microbiología Clínica, por lo que se han comercializado métodos basados en este fundamento que facilitan la identificación de las levaduras.

a) **Métodos manuales**

- Auxacolor® (BioRad): la identificación se realiza basándose en el crecimiento que presenta la levadura por asimilación de distintos azúcares. La lectura se basa en un cambio de color (indicador de pH). Además, la galería incorpora una prueba de resistencia a la actidiona y otra para determinar la actividad de la fenol-oxidasa, importante para la identificación de *C. neoformans*. Permite la identificación de 26 especies diferentes de levaduras.
- Sistema Uni-Yeast-Tek® (Remel): se basa en la asimilación de siete hidratos de carbono, a la vez que determinamos el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas, asimilación y reducción de nitratos y producción del tubo germinal (Tween 80). El cambio de color de azul a amarillo determina la positividad para la prueba de asimilación de azúcares y el cambio de azul a verde para la reducción de nitratos.
- API 20C AUX® (bioMérieux): se inoculan, con un medio semisólido, 20 cúpulas con sustratos carbonados deshidratados. El crecimiento se produce si presenta capacidad de utilizar dicho sustrato inoculando un medio mínimo semisólido. La lectura de la prueba genera un código numérico que facilita la identificación de 34 especies de levaduras distintas.
- RapID Yeast Plus System® (Remel): detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, urea y ácidos grasos. Identifica un total de 43 especies de levaduras.
- Fungiscreen 4H® (Bio-Rad): estudia el perfil enzimático de algunas levaduras observándose un cambio de color. Permite identificar cuatro especies distintas.

Además de todos los métodos manuales que hemos descrito anteriormente, en los últimos años, los métodos automáticos y semiautomáticos han adquirido un papel muy importante en los laboratorios de Microbiología Clínica.

b) **Métodos semiautomáticos**

- Galería ID 32C® (bioMérieux): la galería está constituida por 32 cúpulas (sustratos carbonados deshidratados, control negativo, sensibilidad a la esculina y la última prueba colorimétrica para la esculina) y la lectura se realiza como la explicada para el API 20C AUX®. Presenta como novedad la posibilidad de realizar una lectura automática mediante los equipos ATB Expresión o Mini API, y aumentar hasta 63 el número de especies identificables.
- Sistema Vitek® (bioMérieux): tarjeta que incluye 30 celdillas con un total de 26 pruebas convencionales (utilización de hidratos de carbono, nitrógeno y actividades enzimáticas) y los controles correspondientes. La lectura se realiza por medio de densidad óptica, identificándose 16 especies distintas del género *Candida*.

c) **Métodos automáticos**

- Sistema Vitek 2® (bioMérieux): incluye 63 pocillos con pruebas bioquímicas (utilización de carbohidratos y de compuestos nitrogenados) que permiten la identificación de 51 especies del género *Candida* en 15 h, aproximadamente. La lectura se realiza por emisión de fluorescencia.
- Sistema Biolog YT Microplate® (Biolog): se realiza un total de 94 pruebas bioquímicas identificándose 286 especies de 53 géneros diferentes.

- Rapid Yeast Identification Panel MicroScan® (Dade Behring): se inocula una placa de microdilución con 96 pocillos, presentándose 27 sustratos diferentes deshidratados. Identifica 40 especies diferentes.

A pesar de ser el cultivo el patrón de referencia del diagnóstico microbiológico, ya que permite la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad, presenta inconvenientes, entre los que podemos destacar la necesidad de obtener muestras invasivas, las cuales no están indicadas en muchos de los pacientes que estudiamos debido a la inmunosupresión o enfermedad debilitante que presentan, la contaminación de la muestra, no diferenciar entre infección y colonización, presentar baja sensibilidad y tratarse de un método lento para realizar el diagnóstico.

MÉTODOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas, independientes del cultivo, con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para obtener el diagnóstico. Las principales técnicas podemos clasificarlas de la siguiente manera: a) detección en sangre de antígenos o anticuerpos, b) detección de metabolitos y c) detección de otros componentes fúngicos.

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS O ANTICUERPOS

Debido a la existencia de una antigenemia intermitente en los pacientes que sufren una candidemia, necesitamos una combinación de técnicas que detecten distintos antígenos, junto a la determinación de anticuerpos, para aumentar su sensibilidad. La comercialización de nuevas técnicas para la detección de antígenos de *Candida*, en principio, debería facilitar el diagnóstico mediante pruebas serológicas, aunque debemos destacar la presencia de grandes inconvenientes y dificultades para su interpretación. El estudio de los niveles de anticuerpos anti-*Candida* se cuestiona en pacientes con candidiasis invasora por dos causas fundamentales, la positividad que aparece en pacientes que sólo están colonizados, y la baja o nula respuesta en pacientes inmunodeprimidos. Basándonos en estas premisas, hemos de tener precaución con la interpretación de estos resultados, y utilizar simultáneamente distintas técnicas para confirmar los positivos.

- Platelia Candida Ag® (BioRad): ELISA que detecta el antígeno manano en suero, utilizando el anticuerpo monoclonal EBCA 1, que reconoce los residuos β -1,5 del manano. Las distintas especies que presentan reacción positiva son: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*. Presenta reacción cruzada frente a género *Aspergillus* y género *Cryptococcus*. El límite de detección de la técnica es de 0,25 ng/ml, presentando una sensibilidad y especificidad del 40% y 53%, respectivamente.
- Platelia Candida Ab/Ac/Ak® (BioRad): técnica de ELISA que detecta anticuerpos frente al antígeno manano. Presenta una sensibilidad y una especificidad de un 50% y 94% respectivamente. La utilización simultánea de esta técnica diagnóstica con Platelia Candida (antígeno) aumenta la sensibilidad del diagnóstico a un 80%, manteniéndose la especificidad (93%).
- Anticuerpo antimicelio de *C. albicans*® (Vircell): Prueba de inmunofluorescencia indirecta que detecta la presencia de anticuerpos frente al antígeno del micelio de *C. albicans*. Aunque la técnica detecta anticuerpos contra antígenos expresados en *C. albicans*, también es positiva en pacientes con candidiasis invasora por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*. Tiene gran utilidad para el diagnóstico y el seguimiento de la respuesta que desarrolla el paciente frente al tratamiento administrado. Títulos iguales o superiores a 1/160 son

compatibles con la existencia de candidiasis invasiva. La fase levaduriforme no presenta fluorescencia, la fluorescencia debe aparecer restringida a la fase micelial. La especificidad y la sensibilidad son del 84% y del 94,7%, respectivamente.

DetECCIÓN DE METABOLITOS

La detección de metabolitos es una posibilidad diagnóstica que aparece como alternativa a las técnicas convencionales para el diagnóstico de la infección fúngica.

- D-arabinitol: es un metabolito liberado por la orina del paciente, producido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr*. Su determinación puede realizarse por dos técnicas diferentes: cromatografía gas-líquido o técnicas enzimáticas. Se trata de una técnica prometedora en casos de candidiasis en niños inmunodeprimidos, presentando falsos positivos los pacientes con insuficiencia renal o en tratamiento prolongado con esteroides. En la actualidad ha caído en desuso.

DETECCIÓN DE COMPONENTES FÚNGICOS

- El (1-3) β -D-glucano es un componente de la pared celular de la mayoría de los hongos, exceptuando *C. neoformans* y zigomicetos, que es capaz de activar la vía de la coagulación de los amebocitos de *Limulus* activando el factor G, y generando componentes coloreados usando reactivos diazo. Existen dos equipos comerciales: FungitecC® (FungitecG, Japón) y GlucateLL® (Associates of Cape Cod Ind. USA), con una sensibilidad del 90% y especificidad del 100%. Aparecen falsos positivos en las siguientes situaciones: hemodiálisis con membranas de celulosa o albúmina, tratamiento con inmunoglobulinas, antitumorales y sulfamidas.
- Detección de ácidos nucleicos: el incremento de las infecciones fúngicas y la lentitud que presenta el cultivo y la identificación de muchas especies ha motivado el interés para desarrollar nuevas técnicas diagnósticas más precoces y específicas basadas en la Biología Molecular. Los métodos de hibridación y amplificación son fundamentales en este tipo de diagnóstico. Otra técnica desarrollada actualmente es la PCR cuantitativa en tiempo real, que se está convirtiendo en el método diagnóstico más extendido mediante el sistema LightCycler (Roche Diagnostics). Las sondas que se utilizan para amplificar las zonas dianas del ADN ribosómico y ADN mitocondrial son del tipo Taqman o FRET (Fluorescente Resonante Energy Transfer), o bien utilizando iniciadores específicos y fluorocromos genéricos del tipo SYBRgreen. La difusión de técnicas moleculares de tipificación ha demostrado que existe una gran variabilidad genómica dentro de las especies, por lo que las reordenaciones taxonómicas son continuas. La aparición de estas técnicas moleculares abre un nuevo camino en el diagnóstico de la infección fúngica, pero no se debe olvidar los inconvenientes que aún encontramos, como el elevado coste de dichas técnicas, la necesidad de personal especializado y, sobre todo, la ausencia actual de estudios que demuestren qué tipo de muestra y qué procedimiento es el más indicado.

En resumen, aunque se ha avanzado mucho en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, no existe todavía un método ideal, estando indicada la utilización combinada de varios métodos diagnósticos.

Candida dubliniensis

Candida dubliniensis fue identificada como nueva especie en 1995 por J. Sullivan. El aislamiento se realizó en Dublín (Irlanda), razón por la que se denominó "dubliniensis", en un paciente VIH con infección orofaríngea. Desde los comienzos de la década de los 90 se

estaba estudiando la aparición de una nueva especie que presentaba tubo germinal y clamidosporas pero en la que la hibridación con la prueba de "fingerprinting" 27A de *C. albicans* era negativa: después de cinco años en estudio se denominó *C. dubliniensis*.

Los estudios realizados posteriormente demostraron la menor patogenicidad de *C. dubliniensis* comparada con la de *C. albicans*, siendo sus factores de virulencia más relevantes la producción de hifas y la capacidad de tolerar un medio con elevada temperatura y alta concentración de NaCl y H₂O₂. Al contrario que ocurre con *C. albicans*, *C. dubliniensis* no forma parte de la microflora normal del hombre, provocando infecciones en menos de un 2% de los casos. *Candida dubliniensis* aparece normalmente asociada con episodios recurrentes orales como gingivitis y, aisladamente, en muestras vaginales de pacientes inmunodeprimidos. En alguna ocasión también se han descrito infecciones en pacientes con tratamiento citotóxico para el rhabdomioma y en pacientes hematológicos con trasplante alogénico.

Para el diagnóstico de la infección por esta levadura podemos recurrir al cultivo e identificación, para lo cual se han desarrollado nuevas técnicas que permiten diferenciar *C. dubliniensis* de otras especies, especialmente *C. albicans*. En primer lugar podemos utilizar el medio cromogénico CHROMAgar *Candida* para un diagnóstico presuntivo; a partir de una colonia verde intensa sospecharemos la posibilidad de *C. albicans* o *C. dubliniensis* (ésta última presenta mayor intensidad de color a las 48 h de incubación). Para realizar un diagnóstico diferencial entre ambas especies observaremos la producción de clamidosporas, más abundantes en el caso de *C. dubliniensis* en medio agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria y la producción del tubo germinal. La capacidad de crecer a 42°C y 45°C también es importante para realizar la discriminación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*.

Además, existen sistemas comerciales que permiten la identificación de *C. dubliniensis* como el API ID 32C, API 20C AUX, RapID Yeast Plus, VITEK YBC y VITEK 2. Además de estos sistemas comercializados, existen medios de cultivos diferenciales que permiten la identificación, entre los que destacamos el medio Pal's Agar (*C. dubliniensis* produce hifas alrededor de la colonia) y Tobacco Agar en el cual además de producir *C. dubliniensis* hifas alrededor de la colonia, ésta aparece de color amarillento-marrón, frente a la ausencia de hifas y el tono blanco-crema de la colonia de *C. albicans*. Otro método rápido para identificar esta especie es mediante una técnica de aglutinación (Bichro-dubli®).

Entre los métodos no basados en el cultivo, la infección invasora producida por *C. dubliniensis* puede ser diagnosticada por Platelia *Candida* Ag®, Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak® y por anticuerpos antimicelio de *C. albicans*®. El diagnóstico molecular es importante, ya que la secuenciación de la fracción V3 de la región variable de la subunidad 18S del ADNr es fundamental para diferenciarla de *C. albicans*. Además de esta técnica, la realización de *fingerprinting* y patrones de cariotipos son alternativas para realizar la identificación. Otra posibilidad de identificación, actualmente, es mediante protocolos de PCR y restricción con endonucleasas.

Por último, revisaremos el patrón de sensibilidad que presenta *C. dubliniensis*, destacando su alta sensibilidad frente a los antifúngicos utilizados en clínica, con la salvedad del fluconazol. Es característica la adquisición de resistencia adquirida a fluconazol *in vitro*, no observada frente al resto de azoles (itraconazol, ketoconazol, voriconazol, etc.), destacando como mecanismo de resistencia más frecuente la sobreexpresión de la proteína Mdr1p (codificada por el gen CdCDR1), mientras que en *C. albicans* la proteína que se sobreexpresa es Cdr1 (gen CDR1-CDR2).

Como conclusión podemos destacar que *C. dubliniensis* debe ser considerado como un patógeno emergente asociado con infección oral en los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo los infectados por el VIH. Para su identificación presuntiva en muestras clínicas se recomienda la utilización de CHROMAgar Candida y, una vez aislada, la colonia de color sugestivo realizaremos pruebas complementarias para obtener la correcta identificación (figura 1).

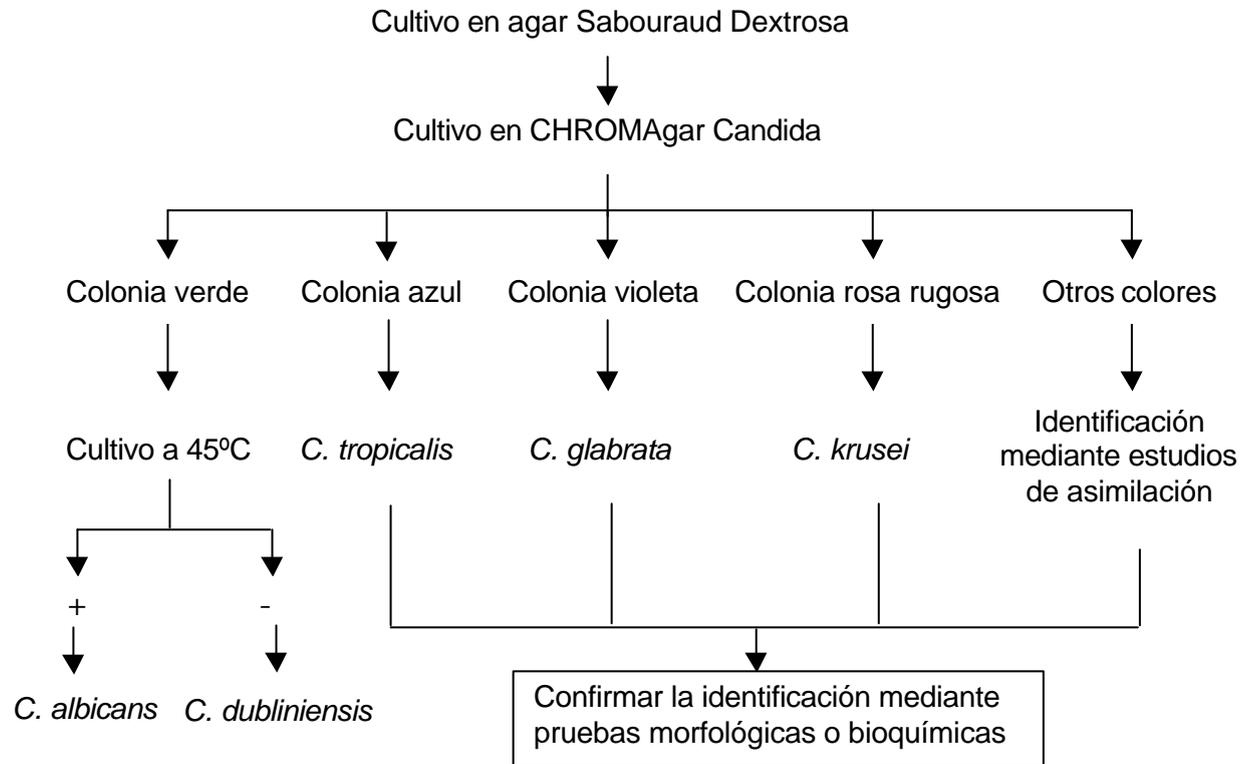


Figura1. Identificación de especies de *Candida* en cultivo (adaptado de Linares et al).

BIBLIOGRAFÍA

- AL MOSAID A, SULLIVAN DJ, COLEMAN DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. J Clin Microbiol 2003; 41:4787-4789.
- DIGNANI MC, SOLOMKIN JS, ANAISSIE EJ. *Candida*. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). Clinical Mycology (1ª ed). New York: Churchill Livingstone, 2003; pp 195-239.
- CARRILLO-MUÑOZ AJ, QUINDOS G, CARDENES CD, et al. Performance of Bactocard Candida compared with the germ tube test for the presumptive identification of *Candida albicans*. Mycoses 2003; 46:467-470.
- CONTRERAS I, SAN-MILLAN R, AGUSTIN-BARRASA A, PONTÓN J, QUINDOS G. Utility of Albicans ID plate for rapid identification of *Candida albicans*. Micopathologia 1996; 136:17-20.
- GUTIÉRREZ J, MORALES P, GONZÁLEZ MA, QUINDOS G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J Basic Microbiol 2002; 42:207-227.
- HAZEN K.C, HOWELL SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of clinical microbiology (8ª ed). Washington: ASM Press 2003; pp 1693-1712.

- KHAN ZIA U, AHMAD S, MOCADAS E, CHANDY R. Tobacco Agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2004; 42:4796-4798.
- LARONE DH. Medically important fungi. A guide to identification (4th ed). Washington: ASM Press, 2002; pp 115.
- LINARES MJ, SOLÍS F. Identificación de levaduras (cap 11). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC (eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica (1^a ed). Madrid: Revista Iberoamericana de Micología, 2001; pp 1-18.
- PEMÁN J, APARISI N, GARCÍA-ESTEBAN C, GOBERNADO M. Rapid identification of *Candida glabrata* using a new comercial kit. Rev Iberoam Micol 2004; 21:82-84.
- PONTÓN J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19:25-29.
- QUINDOS G, SAN MILLAN R, BIKANDI J, PONTON J. Utility of Fluoroplate Candida for the rapid identification of *Candida albicans*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996; 14:586-589.
- SULLIVAN D.J, MORAN G, PINJON E, *et al.* Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res 2004; 4:369-376.