

Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*

Luz Mila Mesa¹, Noris Arcaya¹, Omaira Cañas¹, Yazmin Machado¹ y Belinda Calvo²

¹Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis y ²Cátedra de Medicina Tropical, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela

Resumen Se evaluaron varias pruebas fenotípicas para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Se estudiaron 55 aislamientos clínicos previamente identificados como *C. albicans* en base a sus características morfológicas y fisiológicas. Se emplearon CHROMagar *Candida* para denotar el color de la colonia, agar glucosado de Sabouraud para determinar el desarrollo a 45 °C, agar Tween 80 para observar la actividad lipolítica y agar de Staib para observar la morfología colonial y la formación de clamidoconidias. De los 55 aislamientos, siete presentaron una o más características fenotípicas sugestivas de *C. dubliniensis* y se realizaron ampliaciones de ADN por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) con primers específicos de esta especie y el test bioquímico API ID 32C, que confirmaron su identidad como *C. albicans*. Las pruebas de análisis de ADN deben ser usadas para la identificación definitiva de *C. dubliniensis*.

Palabras clave *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Características fenotípicas

Phenotypic evaluation to differentiate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*

Summary This study evaluated the phenotypic tests used to differentiate *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. A total of 55 isolates from vaginal secretions, oral cavity and hemoculture were studied. They were originally identified as *C. albicans*, based on their morphological and physiological characteristics. These isolates were tested for colony color development on CHROMagar *Candida* medium, growth at 45 °C on Sabouraud Dextrose agar, lipolytic activity on Tween 80 Agar medium and colony morphology and chlamydoconidia formation on Staib agar medium. Of the 55 isolates studied, seven yielded one or more phenotypic characteristics suggestive of *Candida dubliniensis*. These isolates were tested by PCR with specific primers for *Candida dubliniensis* and API ID 32. The seven isolates were confirmed as *Candida albicans*. All of these finding indicate that DNA based tests should be used for definitive identification of *Candida dubliniensis*.

Key words *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Phenotypic characteristic

En 1995 se describió *Candida dubliniensis* como una nueva especie patógena [25]. Este microorganismo fue inicialmente aislado de cavidad oral de pacientes infectados por el VIH o con sida [24]. *C. dubliniensis* también ha sido aislada de sangre, heces y orina [10,14,15,21]. Se ha reportado que *C. dubliniensis* puede ser tan hábil como *C. albicans* para penetrar las capas epiteliales de los teji-

dos del huésped. Su nivel de producción de proteinasa aspártica puede explicar la asociación de *C. dubliniensis* con la mucosa oral [6,7].

La identificación y diferenciación fenotípica de *C. dubliniensis* y *C. albicans* se basa en la incapacidad de *C. dubliniensis* de desarrollarse a 45 °C, de asimilar el metil D-glucósido y la xilosa [11,18-20,27]. Algunos medios de cultivo podrían servir para diferenciar estas dos especies, como el agar Tween 80, donde se determina la actividad lipolítica de *C. albicans* [22] y el medio agar de Staib. En este sustrato *C. albicans* desarrolla una colonia lisa, brillante, y microscópicamente se observan blastoconidias e hifas. *C. dubliniensis* presenta una colonia opaca, rugosa, con blastoconidias, hifas y clamidoconidias [23]. La morfología colonial en este agar de Staib se ha sugerido como un excelente criterio fenotípico para diferenciar estas especies.

Las pruebas más precisas para diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* son las técnicas moleculares, como DNA fingerprinting, análisis por RAPD o electroforesis de campo pulsado [16,26]. Una técnica molecular con especificidad y fácil de usar es la reacción en cadena de la poli-

Dirección para correspondencia:

Dra. Luz Mila Mesa
Cátedra de Micología
Escuela de Bioanálisis
Facultad de Medicina
Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela
Tel.: +58 261 759 7230
Fax: +58 261 759 7300
Correo electrónico: lmilamesac@cantv.net

Aceptado para publicación el 19 de septiembre de 2004

©2004 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

merasa (PCR) empleando secuencias de genes que no correspondan a subunidades de RNA [3].

En este trabajo se estudiaron 55 aislamientos previamente identificados como *C. albicans* en base a las características morfológicas y fisiológicas como la producción de clamidoconidias en crema de arroz Tween 80 agar y la asimilación y fermentación de carbohidratos [12]: 24 de secreciones vaginales, 17 de cavidad oral y 14 de hemocultivo. Estos aislamientos fueron proporcionados por el Laboratorio de Micología, Cátedra de Micología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Se usaron como referencia los aislamientos *C. albicans* ATCC90028 y *C. dubliniensis* (514, J930822a, J9326634), éstos últimos cedidos por el Dr. Neil Gow. Los aislamientos fueron mantenidos durante la investigación en agar glucosado de Sabouraud 4 °C.

Se utilizó como sustrato para el ensayo de la producción de clamidoconidias el medio agar de Staib o agar *Guizotia abyssinica*-Creatinina (*G. abyssinica* pulverizada 50 g, glucosa 1 g, KH₂PO₄ 1 g, creatinina 1 g, agar 15 g, agua destilada 1 l) [23]. Para evaluar la actividad lipolítica, mediante la formación de un halo de opacidad, se utilizó el agar Tween 80 (peptona 10 g, NaCl 5 g, CaCl₂ 0,1 g, agar 15 g, agua destilada 1 l) [22]. CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, France) fue empleado con la finalidad de observar la diferencia de tonalidad de color verde entre las especies en estudio. El medio agar glucosado de Sabouraud (peptona 10 g, dextrosa 20 g, agua destilada 1 l) fue usado para determinar el crecimiento a 45 °C.

Los aislamientos se sembraron en agar glucosado de Sabouraud e incubaron a 45 °C con observaciones a las 48 y 72 h. Para la determinación de la actividad lipolítica las cepas se sembraron en agar Tween 80 e incubaron a 28 °C con observaciones a las 48 y 72 h. Los aislamientos se sembraron en CHROMagar Candida e incubaron a 37 °C durante 72 h. El color de las colonias se clasificó en verde claro y verde.

Los aislamientos se sembraron en agar de Staib e incubaron a 28 °C durante 72 h. Se determinó el aspecto (liso o rugoso) y la opacidad (brillante u opaca) de la colonia. La observación microscópica se realizó mediante examen directo con azul de algodón como líquido de montaje. La producción de clamidoconidias en agar de Staib se determinó según la técnica de Dalmau [12] con observaciones a las 48 y 96 h, y a los 7 y 10 días.

Cinco aislamientos de cavidad oral y dos de hemocultivo fueron evaluados mediante API ID 32C [18] y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de *C. dubliniensis*, de acuerdo a la técnica descrita por Donnelly et al. [3].

El crecimiento a 45 °C en agar glucosado de Sabouraud mostró que cuatro aislamientos orales (7,3%)

no crecieron. Tres aislamientos (5,4%), dos de cavidad oral y uno de hemocultivo, presentaron un crecimiento escaso (Tabla 1). Dos aislamientos (3,6%), uno de cavidad oral (HIV +) y otro de secreción vaginal, no produjeron el halo de opacidad característico de actividad lipolítica (Figura 1). Tres aislamientos (5,4%) mostraron actividad lipolítica a los siete días (Tabla 1). En CHROMagar Candida 54 aislamientos (98%) desarrollaron colonias verde claro y un aislamiento (2%) colonias verdes (Tabla 1).

En agar de Staib (Tabla 2) a las 48 h 52 aislamientos (94,6%) desarrollaron colonias lisas y brillantes. Microscópicamente se observaron blastoconidias y/o hifas. Tres aislamientos desarrollaron colonias opacas: dos lisas (un aislamiento de cavidad oral y otro de hemocultivo) y una rugosa (aislamiento oral). Los aislamientos orales (HIV+) con colonias opacas presentaban blastoconidias, hifas y abundantes clamidoconidias.

Cuarenta y seis aislamientos (83,6%) no produjeron clamidoconidias en agar de Staib hasta los 10 días de observación (Tabla 2). A las 48 h, dos aislamientos orales (3,6%) produjeron abundantes clamidoconidias (Figura 2). A las 96 h, cuatro aislamientos (7,2%) produjeron clamidoconidias.

C. albicans y *C. dubliniensis* presentan una estrecha relación filogenética. Ambas poseen la capacidad de adherirse a las superficies epiteliales, de secretar proteinasas, de producir tubos germinales y clamidoconidias [6]. La similitud de estas especies puede hacer que en el laboratorio microbiológico se identifique en forma errónea *C. dubliniensis* como *C. albicans*. Se han reportado diversas pruebas fenotípicas para diferenciarlas [1,4,9,13,17-19,22,23].

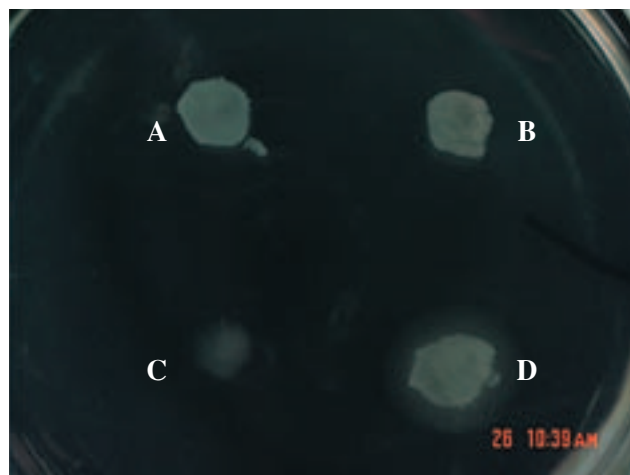


Figura 1. Actividad lipolítica en agar Tween 80. A: *C. dubliniensis* J930822a; B: aislamiento de secreción vaginal 429; C: aislamiento oral 47; D: *C. albicans* ATCC 90028.

Tabla 1. Características fenotípicas evaluadas en los aislamientos.

Origen de los aislamientos (n)	Desarrollo a 45 °C		Actividad lipolítica		Tonalidad de color en CHROMagar	
	+	-	+	-	Verde pálido	Verde
Cavidad oral (17)	13 (2 escaso)	4	16	1	16	1
Hemocultivo (14)	14 (1 escaso)	-	14	-	14	-
Secreción vaginal (24)	24	-	23*	1	24	-
TOTAL (%)	51 (92,7)	4 (7,3)	53 (96,4)	2 (3,6)	54 (98,2)	1 (1,8)

* Tres aislamientos a los siete días

La cepa de referencia *C. albicans* ATCC 90028 desarrollo a 45 °C y presentó actividad lipolítica. Las cepas de *C. dubliniensis* 514, J930822a y J9326634 no desarrollaron a 45 °C, se observó actividad lipolítica en la cepa J9326634

Tabla 2. Características fenotípicas macro- y microscópicas de los aislamientos en el medio Staib agar.

Origen de los aislamientos (n)	Colonia lisa, brillante	Colonia lisa, opaca	Colonia rugosa, opaca	Clamidoconidias (tiempo de observación)	
				Ausencia	Presencia
Cavidad oral (17)	15	1	1	11	2 (48h) 2 (72h) 2 (7d)
Hemocultivo (14)	13	1	–	13	1 (96h)
Secreción vaginal (24)	24	–	–	22	1 (96h) 1 (7d)

La cepa de referencia *C. albicans* ATCC 90028 desarrolló una colonia lisa y brillante, no produjo clamidoconidias.

Las cepas *C. dubliniensis* 514, J930822a y J932634 desarrollaron colonias lisas y opacas, la cepa 514 no produjo clamidoconidias.



Figura 2. Morfología microscópica en agar de Staib del aislamiento oral 64 (x400).

El crecimiento a 45 °C es una de estas pruebas pero algunos aislamientos de *C. albicans* pueden no crecer a esta temperatura o hacerlo en forma escasa [2,4,8,11]. La actividad lipolítica en agar Tween 80 no se apreciaba en el 3,6% de los aislamientos de *C. albicans* estudiados por nosotros, dato que difiere con el 100% de positividad reportado por Slifkin con 2 a 3 días de incubación [22].

El color de la colonia en CHROMagar Candida resultó un buen criterio fenotípico para la diferenciación presuntiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, ya que ninguno de los 55 aislamientos de *C. albicans* presentó la tonalidad verde oscuro típica de *C. dubliniensis*. Sin embargo, Tintelnot y cols. han observado un 30,7% de aislamientos de *C. albicans* que desarrollaron una colonia verde oscuro en este medio [27]. Se ha sugerido que el color verde oscuro en CHROMagar Candida en cultivo primario es un marcador fenotípico presuntivo de *C. dubliniensis*, ya que este color se puede perder con los sucesivos subcultivos y el almacenamiento [11]. Para Odds y

cols. [15] el color de la colonia no es un criterio fiable para la detección de *C. dubliniensis* entre las cepas de colección. Por otra parte, se ha observado el color verde oscuro de las colonias en subcultivos cuando se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad por más de 48 h [8].

La presencia de colonias opacas en tres aislamientos (5,5%) en el agar de Staib difiere de lo reportado en otro estudio [1] donde el 100% de los aislamientos de *C. albicans* produjeron colonias lisas y brillantes y *C. dubliniensis* produjo colonias rugosas en un 97%. La morfología colonial en el agar de Staib se considera un buen carácter para la identificación de estas especies, pero no debe ser usado como único criterio para la identificación en un aislamiento primario [1].

La formación de clamidoconidias por seis aislamientos (10,9%) de *C. albicans* en el agar de Staib entre 48 y 96 h de incubación contrasta con otros trabajos publicados [1,23] donde ninguno de los aislamientos de *C. albicans* produjeron clamidoconidias. Sin embargo, se ha reportado un porcentaje significativo de aislamientos de *C. dubliniensis* (14,6%) que no forman clamidoconidias en este medio [1]. La presencia de abundantes clamidoconidias se considera de bajo valor para diferenciar estas especies [27].

La prueba fisiológica API ID 32 C identificó como *C. albicans* los aislamientos sugestivos de *C. dubliniensis*, confirmando lo reportado por otros autores [4,5,10,11,14,18,20] que el API 20C y API 32C son capaces de diferenciar en forma rápida y fiable *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela por la financiación. Las autoras agradecen especialmente al Dr. David Coleman por su valiosa colaboración en la realización de las pruebas de PCR y API ID 32C, y al Dr. Neil Gow por las cepas de referencia de *C. dubliniensis*.

Bibliografía

1. Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid ferric citrate agar. J Clin Microbiol 2001; 39: 323-327.
2. Dolapci I, Tekeli A, Gocmen S J, Aysev D, Guriz H. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp positive hemocultures. APMIS 2002; 110: 391-395.
3. Donnelly S, Sullivan D, Shanley D, Coleman D. Phylogenetic analysis and identification of *Candida dubliniensis* based on analyses of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology 1999; 145: 1871-1882.
4. Gales A, Phaller M, Houston A, Joly S, Sullivan D, Coleman D, Soll D. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and a-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C and Vitek YBC Systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3804-3808.
5. Giammanco G M, Pignato S, Salvo S, Giammanco G. Carbohydrate assimilation profiles of the first Italian *Candida dubliniensis* clinical isolates recovered from HIV-infected individual. Res Microbiol 2000; 151: 889-891.
6. Giffillan G, Sullivan D, Haynes K, Parkinson T, Coleman D, Gow N. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology 1998; 144: 829-838.
7. Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kähkölä P, Pirinen S, Alakomi H, Perheentupa J, Asikainen S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 238-244.
8. Jabra-Rizk M, Baqui A, Kelley J, Falkler W, Merz W, Meiller T. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. J Clin Microbiol 1999; 37: 321-326.
9. Jabra-Rizk M, Falkler W, Merz W, Kellery J, Baqui A, Meiller T. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1464-1468.
10. Jabra-Rizk M, Falkler W, Merz W, Baqui A, Kelley J, Meiller T. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non-infected individuals. J Clin Microbiol 2000; 38: 2423-2426.
11. Kirkpatrick W, Revankar S, McAtee R, Lopez-Ribot J, Fothergill A, McCarthy D, Sanche S, Cantu R, Rinaldi M, Patterson T. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus- infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida*. Screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 3007-3012.
12. Kurtzman C, Fell J. The yeasts, A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1998: 82-92.
13. Mahmoudabadi A, Radcliffe C, Coleman D, Drucker D. Comparison of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* based on polar lipid composition. J Appl Microbiol 2002; 93: 894-899.
14. Marriott D, Laxton M, Harkness J. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. Emerg Infect Dis 2001; 7: 479.
15. Odds F, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin Microbiol 1998; 36: 2869-2873.
16. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen J, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. Clin Microbiol 2001; 39: 4138-4141.
17. Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Seibold M, Lütticken R, Haase G. Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. J Clin Microbiol 2000; 38: 3696-3704.
18. Pincus D, Coleman D, Pruitt W, Padhye A, Salkin I, Geimer M, Bassel A, Sullivan D, Clarke M, Hearn V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3533-3539.
19. Pinjon E, Sullivan D, Salkin D, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2093-2095.
20. Salkin F, Pruitt A, Padhye A, Sullivan D, Coleman D, Pincus D. Distinctive carbohydrate assimilation profile used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. J Clin Microbiol 1998; 36: 1467.
21. Sebtí A, Kiehn T, Perlín D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, Park S, Sepkowitz K. *Candida dubliniensis* at a cancer center Clin Infect Dis 2001; 32: 1034-1038.
22. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol 2000; 38: 4626-4628.
23. Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. Mycoses 1999; 42: 521-524.
24. Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood O, Fint S, Mulcahy F, Shanley D, Coleman D. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *Candida albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus positive and AIDS patients. J Clin Microbiol 1993; 31: 2124-2133.
25. Sullivan D, Westerneng T, Haynes K, Bennett D, Coleman D. *Candida dubliniensis* sp. new: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141: 1507-1521.
26. Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K. Molecular characterization of a new clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in Japan: analyses reveals a new genotype of *Candida albicans* with group I intron. J Clin Microbiol 2001; 39: 4309-4315.
27. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 1599-1608.