

# Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*

C. LÓPEZ\*, L. GIRO, L. RAMOS, S. RAMADÁN, L. BULACIO

Centro de Referencia en Micología (CEREMIC). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.  
UNR. Suipacha 531. Rosario 2000.

\*Correspondencia. E-mail: clopez@fbioyf.unr.edu.ar

## RESUMEN

Las diferentes especies del género *Candida* producen una variedad de enfermedades, desde infecciones mucocutáneas leves a formas diseminadas graves. Tradicionalmente, la taxonomía de las levaduras se ha llevado a cabo en base a estudios morfológicos y fisiológicos, pero éstos dependen de las condiciones de cultivo de las cepas, por lo que se han observado diversas dificultades. Por tal motivo, recientemente, se han probado técnicas de biología molecular. El objetivo de este trabajo es correlacionar los estudios taxonómicos de las especies correspondientes a las principales patógenas: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, realizados por técnicas fenotípicas tradicionales, métodos comerciales y por PCR fingerprinting. Al comparar las técnicas que identifican *Candida albicans*, agar harina de maíz y formación de tubos germinativos, estadísticamente se observa que no existen diferencias significativas entre ambos métodos (valor de la estadística  $\chi^2 = 0,5$  p = 0,4795). Comparando los métodos que discriminan especies de *Candida*: pruebas fisiológicas, CHROMagar, API20C y PCR fingerprinting se observó que no existen diferencias significativas en las proporciones de resultados que identifican cualquier *Candida* entre las pruebas fisiológicas, API20C y PCR fingerprinting. La proporción de resultados definitivos es mayor a la obtenida usando el método CHROMagar (p < 0,001).

**Palabras clave:** *Candida*, especies, taxonomía

## SUMMARY

**Comparison of different methods for species identification of genus *Candida*.** Different species of genus *Candida* can cause a wide range of pathologies, since mucocutaneous trivial infections to disseminated serious forms. Traditionally, taxonomy of yeast has been performed taking into account morphologic and physiologic studies, but they depend on the culture conditions of strains, what cause certain difficulties. Thus, recently, molecular biology methods have been tried. The aim of this work is to correlate taxonomic studies of most important pathogenic species -*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*- all of them performed by phenotypic traditional methods, commercial ones, and by a molecular method, PCR fingerprinting. Comparing useful methods for *C. albicans* identification, corn flour agar and germinative tube formation, no statistical differences between them are observed ( $\chi^2 = 0.5$ , p=0.4795). By comparison between methods to discriminate different *Candida* species, physiological tests, CHROMagar, API 20C and PCR fingerprinting we observed no significant differences in proportion of accurate results, in test that can identify any *Candida* species, such as physiological assays, API 20C and PCR fingerprinting. The proportion of unequivocal results is greater than the obtained performing the CHROMagar culture method (p < 0.001).

**Key words:** *Candida*, species, taxonomy

## INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Candida* son un grupo de levaduras sumamente ubicuas y con características muy diversas. Este género abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas, como fue determinado por un estudio de aislamientos a partir de pacientes clínicos.

El potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, siendo el microorganismo más virulento *Candida albicans*, especie del género capaz de generar con mayor frecuencia enfermedad mortal en seres humanos (18). *C. tropicalis* es la segunda levadura de importancia en cuanto a su patogenicidad. *C. parapsilosis* también aparece con cierto grado de viru-

lencia, asociada a micosis oportunistas. Por otra parte, no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica (16). Otras especies de *Candida* causan algunas infecciones, pero la debilidad del huésped debe ser muy marcada para permitir que estos microorganismos menos virulentos lo invadan. En el sentido más estricto de la palabra, no existen levaduras patógenas por naturaleza; las que están relacionadas con enfermedad en el hombre o animales, son incapaces de producir infección en un individuo sano. Se deben presentar algunas alteraciones en las defensas celulares del huésped, en la fisiología, o en la composición de la flora normal para que pueda producirse la colonización, infección y la enfermedad por levaduras (1, 5, 6, 10, 14, 17, 26, 29).

A pesar de que *C. albicans* es la especie del género *Candida* aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, en los últimos años se ha informado la emergencia de otras especies de *Candida* como agentes infecciosos. Aunque las razones de esta emergencia no están totalmente definidas, se ha sugerido que un factor importante podría ser la carencia relativa de sensibilidad a fluconazol y otros azoles, administrados corrientemente para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Se ha observado que *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensibles a fluconazol que *C. albicans* (20, 22).

Dado que muchas de las especies de *Candida* clínicamente relevantes son anamorfias y carecen de características sexuales, que son las principales características morfológicas en que se basa la clasificación de hongos, la taxonomía de este grupo heterogéneo de levaduras en base a características morfológicas es subjetiva.

Como en otros ámbitos de la microbiología, también en la micología se han establecido modernos métodos de diagnóstico por biología molecular.

Un rápido ensayo para la identificación de especies de *Candida* se basa en la reacción de polimerización en cadena (PCR). Para este género fueron estudiados diferentes genes blanco, teniendo en cuenta la especificidad y sensibilidad (2).

Existen métodos para la identificación de especies del género *Candida* basados en la variación genética. Estos métodos son: análisis de diferencias cariotípicas electroforéticas y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción genómica (RFLPs) usando electroforesis en gel e hibridación ADN-ADN, respectivamente. El análisis cariotípico-electroforético ha progresado con el desarrollo de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), que resuelve fragmentos de ADN de más de 50 kb sometiéndolos a un campo que alterna su dirección. Las variaciones cariotípicas electroforéticas, con buen resultado han diferenciado muestras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. Un nivel suficientemente alto de discriminación entre especies de *Candida* fueron informadas usando PFGE, lo que sugiere que el enfoque puede ser de valor en la tipificación de especies del género *Candida* (3).

Una versión modificada de PFGE, que es capaz de aumentar la resolución de las bandas de cromosomas grandes, es la electroforesis de campo eléctrico homogéneo (CHEF), que se realiza con ADN previamente embebido en agarosa. Esto es para evitar una excesiva manipulación y prevenir así la ruptura de los grandes fragmentos de ADN que van a hacer analizados. Las grandes moléculas de ADN son separadas en base a su habilidad para relajarse y realinearse a través de los poros de agarosa produciéndose un patrón más agudo y distintivo. Los patrones producidos permiten la cariotipificación electroforética del genoma de varias levaduras incluyendo *C. albicans* y otras especies de *Candida* (15, 21, 28).

El análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) provee una alternativa a la cariotipificación electroforética. El ADN extraído es digerido en fragmentos por enzimas de restricción del ADN antes de la separación en el gel de electroforesis. Cinco especies de *Candida* pueden ser caracterizadas por digestión con *EcoR1*, generando distintos patrones (11).

Los métodos de tipificación basados en PCR *fingerprinting* de amplificación de secuencias repetitivas y no repetitivas, ofrecen la ventaja de una menor manipulación técnica respecto de las técnicas mencionadas anteriormente, sin embargo están relacionadas todavía con una falta de estandarización.

El objetivo de este estudio es correlacionar los estudios taxonómicos de las especies correspondientes a las principales patógenas: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, aisladas en materiales clínicos, realizados por técnicas fenotípicas tradicionales (estudios morfológicos y propiedades bioquímicas), métodos comerciales y por PCR *fingerprinting*.

Este Trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 17 al 21 de octubre de 2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron cepas correspondientes a aislamientos de lesiones en mucosa oral de pacientes provenientes del Servicio de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario.

### Toma de Muestra

Hisopado de mucosa bucal, suspendida en solución fisiológica estéril. Se recogió, con un hisopo estéril, muestras de toda la mucosa oral, en especial del contorno de las lesiones. Si la suspensión era muy diluida, se concentró por centrifugación. Para lograr una máxima recuperación las muestras fueron procesadas inmediatamente, o de lo contrario, guardadas a 4 °C por no más de 24 hs.

### Estudio micológico

Se efectuaron observaciones microscópicas con el material en fresco y con colorante Azul de Lactofenol. La identificación de las levaduras de especímenes clínicos se realizó a través del examen microscópico directo, cultivos y pruebas bioquímicas útiles para los estudios taxonómicos. Además, se efectuaron extendidos que fueron teñidos con la coloración de Gram Nicolle.

Los materiales fueron sembrados en agar-Sabouraud-glucosa (ASG) y agar-Sabouraud-glucosa-cloromicetina (ASGCl) e incubados 72 hs, a 28 °C.

Para realizar el estudio de tipificación de las cepas levaduriformes aisladas se tuvieron en cuenta, tanto las características morfológicas de los cultivos, como así también las propiedades bioquímicas de las mismas.

### Ensayo para la identificación rápida de *C. albicans*

Se utilizó la prueba de formación de tubos germinativos (23). Aproximadamente el 95% de las muestras de *C. albicans* producen tubos germinativos, una propiedad compartida con *C. stellatoidea* y *C. dubliniensis*.

Otra técnica útil para la identificación rápida de cepas de *C. albicans* es la filamentización de las levaduras y formación de clamidoconidias en agar harina de maíz-tween 80 (25).

#### Pruebas bioquímicas

Se realizaron las pruebas tradicionales: auxonogramas de hidratos de carbono, auxonograma para sustancias nitrogenadas y fermentación de sustancias hidrocarbonadas (zimograma) (13, 24).

#### Sistemas comerciales

Para detectar la posible presencia de mezclas de levaduras se utilizó el medio cromogénico de CHROMagar® *Candida*, que permitió además la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, en base al color y a la apariencia de las colonias (4, 7, 8, 9, 12, 19).

También se utilizó el kit de API 20 C® , para una identificación rápida de los aislamientos clínicos.

#### Métodos moleculares

Para llevar a cabo la identificación taxonómica de las especies de *Candida* que fueron aisladas a partir de las muestras clínicas se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos de levaduras desarrollados en caldo YEPD y posteriormente centrifugados, lavados y tratados con proteinasa K.

Para la verificación y posterior estimación de los rendimientos en la extracción de ADN se depositó la muestra resultante en un gel de agarosa 1% y se tiñó con bromuro de etidio. El ADN se visualizó empleando un transiluminador de luz UV. La cantidad de ADN obtenido en cada caso fue estimada por comparación con la concentración del marker » ADN-EcoRI + Hind III (Promega).

Para la identificación molecular, se realizó PCR *fingerprinting*, basada en la detección del polimorfismo en el ADN entre secuencias específicas minisatélite, con el cebador M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'), que permite la detección de dicho polimorfismo aún en ausencia de información de la secuencia nucleotídica.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este estudio se realizaron hisopados de la mucosa oral de pacientes que presentaban lesiones características de candidiasis oral. De las 64 muestras de mucosa analizadas, resultaron 44 (69%) positivas. Se aislaron 27 (61%) cepas de *C. albicans*, 10 (23%) de *C. parapsilosis*, 3 (7%) de *C. tropicalis*, 2 (4,5%) de *C. krusei* y 2 (4,5%) de *C. glabrata*.

Todos los aislamientos clínicos fueron identificados usando cada uno de los métodos de identificación mencionados. A partir de los resultados obtenidos fueron evaluados dichos métodos en términos de factibilidad del protocolo, reproducibilidad de los resultados, tiempo y costo requeridos por cada uno de ellos.

Luego de 7 días de desarrollo a 28 °C en el medio ASG, se observaron las características macro y micro-morfológicas de las colonias aisladas a partir de los hisopados. Dichas observaciones dieron una orientación sobre la especie probable, pero no permitió la identificación exacta de los elementos fúngicos observados debido a la semejanza, en algunos casos, de las mencionadas características.

De las 44 cepas aisladas, 27 produjeron tubos germinativos, lo que nos permitió identificar rápidamente

a estos aislamientos como correspondientes a *C. albicans*, pero no así inferir sobre la identidad de los demás aislamientos.

De las colonias aisladas, 27 produjeron clamidoconidias en agar harina de maíz. Por otro lado 15 aislamientos presentaron formación de pseudomicelio y 2, abundantes células globulares con ausencia de pseudomicelio. Los 27 aislamientos que desarrollaron clamidoconidias fueron asignados a la especie *C. albicans*, pero dicha presunción tuvo únicamente valor taxonómico orientativo, dado que *C. dubliniensis* también desarrolla clamidoconidias en este medio. Por otra parte, los 2 aislamientos que no presentaron formación de pseudomicelio, mostraron un desarrollo compatible con *C. glabrata*.

Las pruebas bioquímicas o fisiológicas de asimilación de sustancias hidrocarbonadas y nitrogenadas, así como también las pruebas de fermentación de carbohidratos arrojaron algunos resultados dispares entre las cepas estudiadas. Sin embargo, a partir de dichas pruebas pudieron ser identificados 43 (98%) de los aislamientos, los cuales presentaron perfiles coincidentes con lo referido en tablas de estudios taxonómicos clásicos. De los 44 aislamientos clínicos, 27 presentaron el perfil de fermentación y asimilación de hidratos de carbono que corresponde a *C. albicans*, 8 presentaron un perfil típico de *C. parapsilosis*, 3 siguieron el perfil que corresponde a *C. tropicalis*, 2 el perfil de *C. glabrata* y 2 el de *C. krusei*. Los 2 aislamientos clínicos restantes, no presentaron perfiles típicos que coincidieran con los tabulados para las diferentes especies de *Candida*.

Utilizando el sistema comercial API 20C, de los 44 aislamientos clínicos estudiados 43 (98%), presentaron perfiles de comportamiento coincidente con el catálogo analítico del proveedor. Un aislamiento (2%) no pudo ser identificado, dado que el sistema brindó un perfil numérico que no correspondía a ninguna especie. Este ensayo arrojó los siguientes resultados: 27 aislamientos fueron identificadas como *C. albicans*, 10 como *C. parapsilosis*, 2 como *C. krusei*, 2 como *C. glabrata*, 2 como *C. tropicalis* y 1 aislamiento no fue identificado.

El desarrollo observado en las colonias sembradas en el medio agar cromogénico CHROMagar, nos permitió determinar el color, la textura y la macromorfología de las mismas. Las cepas de referencias fueron utilizadas como control de la metodología, ya que esta prueba se basa en la apreciación visual. Para cada una de las cepas de referencia se observó un espectro de colores variado, siendo las coloraciones rosadas y blanquecinas compartidas por las especies *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. utilis* y *C. lusitanae*.

El morfotipo observado en las colonias de los aislamientos clínicos nos permitió, en algunos casos, en forma presuntiva asignar a cada uno la especie correspondiente; 27 colonias verde esmeralda: *C. albicans*; 3 colonias azules con halo más claro: *C. tropicalis*; 2 colonias rosa oscuro: *C. glabrata*; 2 colonias rugosas, color rosa

con halo blanco: *C. krusei*. Los 10 aislamientos restantes presentaron coloración rosa pálido, por lo que no pudo ser asignada ninguna identidad con cierta rigurosidad.

Cabe aclarar que los 27 aislamientos clínicos que desarrollaron colonias verdes, presuntivamente fueron incluidos en la especie *C. albicans*, aunque tal coloración también la presenta la especie, recientemente descrita, *C. dubliniensis* (27).

En una primera instancia se empleó la técnica de PCR *fingerprinting* con las cepas de referencia mencionadas anteriormente, para establecer patrones de bandas que pudieran servir de referencia para la identificación taxonómica de las especies aisladas a partir de muestras clínicas. Por tal motivo, se comenzó con determinar el protocolo de extracción más conveniente y las condiciones de reacción de PCR óptimas para obtener patrones de bandas especie-específicos.

Una vez establecidas las condiciones de reacción que produjeron polimorfismos especie-específicos, se utilizó esta técnica para identificar los aislamientos clínicos, los cuales también generaron los perfiles de PCR multilocus específicos a las diferentes especies de *Candida*. Los aislamientos clínicos incluidos en este estudio fueron asignados a una especie por comparación con los patrones de *fingerprint* de las cepas de referencia.

Se observó polimorfismo entre los patrones de bandas de los distintos aislamientos clínicos, con la simplicidad adecuada como para permitir que cada aislamiento sea asignado con certeza a una especie particular. En algunos casos se observaron ligeras diferencias en las intensidades de las bandas entre miembros de una misma especie o entre distintas reacciones, que fueron atribuidas a ligeras variaciones en las condiciones de reacción.

Para analizar si la técnica de PCR *fingerprinting* es reproducible, se realizaron amplificaciones por duplicado de la misma cepa en una PCR y en repetidas PCRs a diferentes tiempos. Dicha técnica resultó reproducible, dado que los patrones de bandas obtenidos fueron siempre los mismos para cada una de las especies estudiadas.

Los repetidos subcultivos no afectaron el patrón de bandas. Los patrones de *fingerprint* se mantuvieron estables aún cuando el ADN de una cepa (*C. albicans* ATCC 64548) fue extraído a partir de diferentes subcultivos de la misma.

El análisis de los patrones de *fingerprint* nos permitió clasificar no sólo taxonómicamente a las especies de *Candida* estudiadas, sino también filogenéticamente, ya que, la técnica de PCR *fingerprinting* y el posterior análisis de los patrones de bandas permitieron agrupar 9 especies de *Candida* en linajes, que reflejan las distancias genéticas entre dichos miembros del género.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con los diferentes métodos utilizados en la identificación taxonómica de los aislamientos.

**Tabla 1.** Comparación de los resultados obtenidos con los diferentes métodos (1)

Cepas	TG	AHM	PF	CHROM	API	PCR fing.
1 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
2 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
3 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
4 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
5 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
6 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
7 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
8 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
9 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
10 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
11 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
12 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
13 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
14 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
15 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
16 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
17 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
18 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
19 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
20 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
21 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
22 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
23 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
24 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
25 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
26 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
27 <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
28 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	+	+
29 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	+	+
30 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
31 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
32 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
33 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
34 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
35 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
36 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
37 <i>C. parapsilosis</i>	ND	ND	+	ND	+	+
38 <i>C. tropicalis</i>	ND	ND	+	+	ND	+
39 <i>C. tropicalis</i>	ND	ND	+	+	+	+
40 <i>C. tropicalis</i>	ND	ND	+	+	+	+
41 <i>C. krusei</i>	ND	ND	+	+	+	+
42 <i>C. krusei</i>	ND	ND	+	+	+	+
43 <i>C. glabrata</i>	ND	+	+	+	+	+
44 <i>C. glabrata</i>	ND	+	+	+	+	+

T.G: formación de tubos germinativos; A.H.M: agar harina de maíz; P.F: pruebas fisiológicas (zimograma-auxanograma); CHROM: CHROMagar; API: API20C; PCRfin: PCR *fingerprinting*; +: resultados específicos; ND: resultados que no permiten determinar inequívocamente la especie.

Al aplicar el test de Mc Nemar para comparar los métodos que identifican *Candida albicans*: agar harina de maíz y formación de tubos germinativos se concluye que no existen diferencias en la proporción de resultados que identifican *Candida albicans* entre ambos métodos estudiados, como se observa en la Fig. 1 (valor de la estadística  $\chi^2 = 0,5$   $p = 0,4795$ ).

Para comparar los métodos que discriminan cualquier especie de *Candida*: pruebas fisiológicas (zimograma-auxonograma), CHROMagar, API20C y PCR *fingerprinting*, se utilizó la prueba Q de Cochran; como muestra la Fig. 2 los resultados nos permiten concluir que no existen diferencias significativas en las proporciones que identifican las especies de *Candida* más frecuentemente aisladas en materiales clínicos entre los métodos fisiológicos, API20C y PCR *fingerprinting*. Además, dichos resultados muestran una mayor eficiencia en la identificación que la que se observa con la utilización del medio CHROMagar ( $p < 0,001$ ).

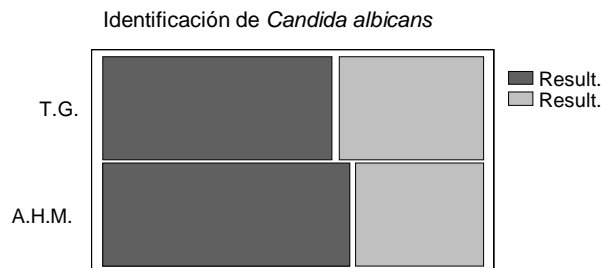
Este método genotípico será de mucha utilidad para la identificación rápida de aislamientos clínicos por comparación con los perfiles obtenidos a partir de las cepas

testigos, ya que como surge del análisis de los resultados, existe una estrecha correlación con las técnicas fenotípicas tradicionales.

**Agradecimiento:** A la Lic. en estadística. Liliana Racca por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

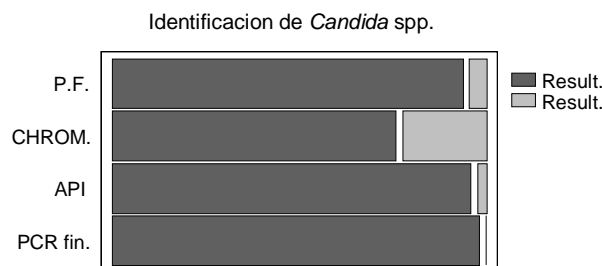
## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre Urizar J M (2002) Candidiasis orales. Rev. Iberoamer. Micol. 19: 17-21.
2. Bartie K L, Williams D W, Wilson M J, Potts A J C, Lewis M A.O (2001) PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. J. Clin. Microbiol. 39: 4066-4075.
3. Becker K (2000) Molecular methods for diagnostic and typing of yeasts. Mycoses. 43: 40-47.
4. Bernal S, Martín Mazuelos E, García M, Aller A, Martínez M A, Gutiérrez M J (1996) Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. Diag. Microbiol. Inf. Dis. 24: 201-204.
5. Cannon R D, Holmes A R, Mason A B, Monk B C (1995) Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis. J. Dent. Res. 74: 1152-1159.
6. Delgado W, Aguirre J M (1997) Las micosis orales en la era del SIDA. Rev. Iberoamer. Micol. 14: 14-22.
7. Freydiere A M, Buchaille L, Gille Y (1997) Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 16: 464-467.
8. Freydiere A M (1996) Evaluation of CHOMagar *Candida* plates. J. Clin. Microbiol. 34: 20-48.
9. García Martos P, García Agudo R, Hernández Molina J M, Marín P, Tallero E, Mira J (1998) Identification of yeasts of clinical interest on CHROMagar *Candida* culture medium. Rev. Iberoamer. Micol. 15: 131-135.
10. Jarvis W R (1995) Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin. Infect. Dis. 20: 1526-1530.
11. Jordan J A (1994) PCR Identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. J. Clin. Microbiol. 32: 2962-2967.
12. Kirkpatrick W R, Revankar S G, McAtee R K, López-Ribot J L, Fothrgill A W, McCarthy D I, et al. (1998) Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. J. Clin. Microbiol. 36: 3007-3012.
13. Kurtzman, C P, Fell J W (1999) Classification of yeasts. En: Elsevier (Ed). The yeasts - a taxonomic study, p. 891-947.
14. Lasker B A, Elie C M, Lott T J, et al. (2001) Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV- positive patients at successive clinic visits. Medical. Micol. 39: 341-352.
15. López-Ribot J L, McAtee R K, Kirkpatrick W R, Perea S, Patterson T F (2000) Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. Rev. Iberoamer. Micol. 17: 49-54.
16. Matthews R, Burnie J (1998) The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: applications in prevention and treatment. Bull. Inst. Pasteur. 96: 249-256.
17. Nikoskelainen J (1991) Infecciones orales relacionadas con la radioterapia y la terapia inmunosupresora. Arch. Odontostomol. 7: 145-150.
18. Odds F C, Bernaerts R (1994) CHROMagar *Candida*, a



Result Def: resultado definitivo; Result Inesp: resultado inespecífico, que no permite arribar inequívocamente a especie.

**Figura 1.** Gráfico de mosaico para la identificación de *C. albicans*, comparando el método de formación de tubos germinativos (T.G.) con la observación de clamidoconidias en agar harina de maíz (A.H.M.)



Result Def: resultado definitivo; Result Inesp: resultado inespecífico, que no permite arribar inequívocamente a especie.

**Figura 2.** Gráfico de mosaico para comparar la identificación de especies del género *Candida* por: pruebas fisiológicas (auxonograma y zimograma) (P.F.), CHROMagar, API20C y PCR *fingerprinting*.

- new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32: 1923-1929.
19. Pfaller M A, Houston A, Coffmann S (1996) Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. glabrata*. J. Clin. Microbiol. 34: 58-61.
  20. Price M F, LaRocco M T, Gentry L O (1994) Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1422-1424.
  21. Ratón T O (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoamer. Micol. 21: 15-19.
  22. Rex J H, Pfaller M A, Barry A L, Nelson P W (1994) Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B for treatment of non-neutropenic patients with candidemia. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 40-44.
  23. Reynolds R, Braude A (1956) The filament-inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. Clin. Res. Proc. 4: 40.
  24. Rippon J W (1982) Culture methods media, stains, and serologic procedures. En: W. B. Saunders Company: Medical Mycology, 2<sup>nd</sup> Ed, p. 772-795.
  25. Rippon J W (1990) Candidiasis y levaduras patógenas. En: Interamericana Mc Graw Hill (Ed). Tratado de Micología Médica, 3<sup>a</sup> Ed, p. 611-614.
  26. Shay K, Truhlar M, Renner R (1997) Oropharyngeal candidiasis in the older patient. J. Am. Geriatr. Soc. 45: 863-870.
  27. Sullivan D, Coleman D (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J. Clin. Microbiol. 36: 329-334.
  28. Vázquez J A, Beckley A, Donabedian S, Sobel J D, Zervo M J (1993) Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *C. albicans*. J. Clin. Microbiol. 31: 2021-2030.
  29. Williams D W, Lewis M A O (2000) Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 6: 3-11.