

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Levaduras del género *candida* de procedencia clínica.
Evaluación de métodos de identificación**

Autor: Cárdenes Perera, Carmen Delia

**Directores: María del Pilar Arévalo Morales
y Alfonso Javier Carrillo Muñoz**

**Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría,
Medicina Preventiva y Salud Pública y Medicina Legal y Forense**

DOÑA **MARÍA DEL PILAR ARÉVALO MORALES**, PROFESORA TITULAR DE LA CÁTEDRA DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DON **ALFONSO JAVIER CARRILLO-MUÑOZ**, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

CERTIFICAN:

Que Dña. **CARMEN DELIA CÁRDENES PERERA**, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a la Tesis Doctoral: **LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN**, apta para ser presentada y defendida, cumpliendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas y que ha finalizado con el mayor aprovechamiento.

Revisada la presente Memoria, estimamos que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedamos conforme con su presentación para ser juzgada por el Tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos procedentes oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos y firmamos el presente certificado en La Laguna a 20 de Septiembre de dos mil.

DIRECTORES

Fdo. Dra. M. Pilar Arévalo Morales

Fdo. Dr. Alfonso Javier Carrillo-Muñoz

“El verdadero Conocimiento no se
divide en compartimentos
porque todo procede de una única verdad””

Robert Fisher

A mi hijo Carlos por alumbrar mi vida.

A mi marido Sebastián por su amor incondicional.

A mis padres por habernos guiado en el camino de la cultura.

A mis hermanos Higinia, Paco y Mari Trini.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que en alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

Al Dr. Don Antonio Sierra López, Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública, por su inestimable colaboración en mi formación en este Departamento y por todas las facilidades puestas a mi disposición a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis directores de tesis, los Dres. María del Pilar Arévalo Morales y Alfonso Javier Carrillo Muñoz, no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis, sino también por el tiempo dedicado, así como por su constante estímulo y apoyo en los momentos más difíciles, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A las Dras. Angeles Arias Rodríguez y Cristobalina Rodríguez Álvarez, Profesoras Titulares de Medicina Preventiva y Salud Pública, por su estimable y desinteresada ayuda en todo momento y su constante preocupación.

A Dña. María Isabel Camacho Quintero, técnico de laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, por su valiosa ayuda en el trabajo diario del laboratorio.

A Don Javier Salgado, Facultativo Especialista de Área del Centro de Especialidades J.A. Rumeu (Santa Cruz de Tenerife), por su colaboración en partes del trabajo práctico, así como su disponibilidad personal y su amable trato.

A la Dña. Consuelo Revert Gironés, Médico Interno Residente del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Canarias, por estar siempre dispuesta a colaborar en la puesta en marcha de cualquier técnica, así como demostrar en todo momento su calidad humana.

Al Dr. Guillermo Quindós, Profesor Titular del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, por su gentileza al cedernos cepas y fotos para la realización de esta tesis, así como por su continua disponibilidad y afabilidad demostrada en tantos momentos de este trabajo.

Al resto de mis compañero/as del Servicio de Microbiología, Parasitología y de Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias, por facilitarme mi trabajo en el Servicio en la recogida de los aislamientos y datos relacionados con los mismos.

A bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia), en la persona de Don Juan Antonio González Pradas, por su apoyo e interés en la realización práctica de este trabajo al ceder gran cantidad de material con rapidez en todo momento.

Un recuerdo especial a mis amigas Julia Amador, Inmaculada Rodríguez y Consuelo Torres, por haber compartido conmigo tanto los momentos buenos como los momentos más duros en los que esta tesis se iba desarrollando. Gracias por darme en silencio la cercanía de la amistad, a pesar de las dificultades.

Por último, expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia por su orientación y apoyo incondicional en todo momento. A Sebas por estar a mi lado y por ese hijo maravilloso que compartimos.

A todos mi reconocimiento.

ÍNDICE.-

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....

I. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

I.1. HISTORIA.....

I.1.1.- Primeros estudios.....

I.1.2.- Origen de la “Monilia” y Moniliasis

I.2. SITUACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *CANDIDA*

I.2.1. Conceptos taxonómicos actuales

I.2.2. Sistemas de clasificación de las levaduras.....

I.2.2.1. Clasificación de Kreger-Van Rij

I.2.2.2 Clasificación de Hoog-Guarro

I.2.2.3. Clasificación de Dixon , Rhodes y Fromtling

I.2.3. Clasificación de levaduras imperfectas.....

I.2.4. Especies del género *Candida*

I.2.4.1. Clasificación del género *Candida*

I.2.4.2. Especies del género *Candida* de interés
en clínica humana

I.2.5. Evolución de la Nomenclatura.....

I.2.5.1. Nuevas especies: *Candida albicans* →*Candida dubliniensis*....

I.3. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS GENERALES DEL GÉNERO *CANDIDA*

I.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA* CON INTERÉS EN CLÍNICA HUMANA

I.4.1. *Candida albicans* (Robin) Berkhout, 1923

I.4.2. *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout, 1923

I.4.3. *Candida kefyr* (Beijerinck) Van Uden y Buckley, 1970.....

I.4.4. *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron y Guerra, 1938.....

I.4.5. *Candida krusei* (Castellani) Berkhout, 1923

I.4.6. *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron y Talice, 1959

I.4.7. *Candida zeylanoides* (Castellani) Langeron y Guerra, 1938

I.4.8. *Candida glabrata* (Anderson) Yarrow y Meyer, 1978

I.4.9. <i>Candida famata</i> (Harrison) Meyer y Yarrow	
I.4.10. <i>Candida lusitaniae</i> van Uden y do Carmo-Sousa, 1959.....	
I.4.11. <i>C. norvegensis</i> (Dietrichson) van Uden y Farinha ex van Uden y Buckley	
I.4.12. <i>Candida viswanathii</i> Sandhu y Randhawa, 1959	
I.4.13. <i>Candida dubliniensis</i> Coleman y Sullivan, 1995.....	
I.5. ECOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA	
I.5.1. Reservorio y Fuente de infección	
I.5.2. Factores que predisponen a la candidiasis	
I.5.2.1. Enfermedades y trastornos predisponentes	
I.5.2.2. Disgresiones de estados fisiológicos normales	
I.5.2.3. Factores dietéticos	
I.5.2.4. Factores mecánicos	
I.5.2.5. Factores iatrogénicos	
I.6. EL GENERO CANDIDA EN PATOLOGIA HUMANA.....	
I.6.1. Formas infecciosas.....	
I.6.1.1. Candidiasis superficiales.....	
I.6.1.2. Candidiasis viscerales	
I.6.1.3. Candidiasis diseminada. Septicemias por <i>Candida</i>	
I.6.2. Formas alérgicas	
I.6.2.1. Alergias cutáneas	
I.6.2.2. Eccema, asma y gastritis	
I.6.2.3. Alergia en otros sitios	
I.7. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL GENERO CANDIDA	
I.7.1. Medios de cultivos para aislamiento.....	
I.7.2. Filamentación en suero	
I.7.3. Técnicas de identificación bioquímicas	
I.7.3.a. API 20C®.....	
I.7.3.b. API 20 C Aux®	
I.7.3.c. API ID 32 C®	
I.7.3.d. API Candida System®	
I.7.3.e. Vitek Yeast Biochemical Card®	
I.7.3.f. Auxacolor®	

I.7.3.g. Quantum II Yeast Identification System®
I.7.3.h. Biolog Microstation System®
I.7.3.i. Uni Yeast-Tek System®
I.7.4. Técnicas de identificación basadas en la detección enzimática
I.7.4.a. RapiID <i>Albicans</i> ®
I.7.4.b. BactiCard™ <i>Candida</i> ®
I.7.4.c. Albistrip®
I.7.3.d. <i>Albicans</i> -Sure®
I.7.4.e. MUAG Candi Kit
I.7.4.f. Murex <i>C. albicans</i> ®
I.7.4.g. Rapidec <i>Albicans</i> ®
I.7.4.h. <i>Candida albicans</i> Screen®
I.7.4.i. Fungichrom I®
I.7.4.j. Fungifast I Twin®
I.7.5. Técnicas de identificación bioquímicas y enzimáticas
I.7.5.a. Fongiscreen 4 H®
I.7.5.b. API Yeast Ident System®
I.7.5.c.- RapID Yeast Plus System®
I.7.5.d- MicroScan Rapid Yeast Identification®
I.7.6.- Identificación cromogénica
I.7.6.a. <i>Albicans</i> ID2®
I.7.6.b. <i>Albicans</i> ID®
I.7.6.c. Candiselect®
I.7.6.d. CHROM <i>Albicans</i> ®
I.7.6.e. CHROMagar <i>Candida</i> ®
I.7.7. Identificación fluorogénica
I.7.7.a. Fluoroplate <i>Candida</i> ®
I.7.7.b. SDCA-MUAG® Agar
I.7.8. Técnicas inmunológicas
I.7.8.a. Reacción de precipitación
I.7.8.b. Técnicas basadas en reacciones de aglutinación
I.7.8.c. Inmunoensayos en fase sólida
I.7.8.d. Inmunofluorescencia

I.7.9. Métodos moleculares	
I.7.9.a. Sondas de ácidos nucleicos	
I.7.9.b. Amplificación de genes: PCR	
I.7.9.c. Amplificación basada sobre la transcripción (3SR)	
I.7.9.d. Amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA)	
I.7.9.e. Reacción en cadena de la ligasa (LCR)	
I.7.10. Técnica de identificación basada en la inhibición del crecimiento	
I.7.10.a. Microring YT®	

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1. PROCEDENCIA DE LAS LEVADURAS

II.2. LEVADURAS AISLADAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS

II.2.1. Frecuencia de los aislados en cultivos mixtos

II.2.2. Distribución de aislados según el servicio

II.2. 3. Distribución y frecuencia de aislados según su procedencia orgánica

II.2. 4. Otras cepas ensayadas en el estudio: *C. dubliniensis* y *C. lusitaniae*

II.2. 5. Cepas de referencia ensayadas

II.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

II.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA

II.4.1. Medios de cultivo utilizados

II.4.2. Densitómetro empleado

II.4.3. Protocolo seguido en el aislamiento e identificación del género *Candida*

II.4.4. Métodos de aislamiento

II.4.5. Test de filamentación en suero

II.4.6. CHROMagar *Candida*®

II.4.7. *Albicans* ID2®

II.4.8. CHROMAlbicans®

II.4.9. BactiCard™ <i>Candida</i> ®
II.4.10. Krusei-color®
II.4.11. API ID 32 C®
II. 4.12. Vitek Yeast Biochemical Card®
II.4.13. Auxacolor®
II.4.14. RapID Yeast Plus System®
II.4.15. MicroScan Rapid Yeast Identification®
II.4.16. Inmunofluorescencia Indirecta
II.4.17. Purificación de levaduras.....

II.5. PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y

TIEMPOS VARIABLES

II.6. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

II.6.1. Concordancia
II.6.2. Comparación entre sensibilidad y especificidad
II.6.3. Comparación entre eficiencia y valor predictivo.....
II.6.4. $p < 0,05$

III. RESULTADOS

III.1. TOTAL DE LEVADURAS ENSAYADAS

III.2. LEVADURAS IDENTIFICADAS CON EL API ID 32C ®

III.3. FRECUENCIA DE CULTIVOS MIXTOS.....

III.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE

LEVADURAS SEGÚN PROCEDENCIA ORGÁNICA

III.4.1. Aislados de levaduras en muestras vaginales.....
III.4.2. Aislados de levaduras en orina.....
III.4.3. Aislados de levaduras en uñas.....
III.4.4. Aislados de levaduras en hemocultivos
III.4.5. Aislados de levaduras en exudados de herida
III.4.6. Aislados de levaduras en coprocultivos
III.4.8. Aislados de levaduras en catéter
III.4.9. Aislados de levaduras en muestras respiratorias
III.4.10. Aislados de levaduras en otras muestras

III.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS POR OTRAS TÉCNICAS

- III.5.1. Test de filamentación en suero.....
- III.5.2. *Albicans* ID 2®.....
- III.5.3. CHROM*albicans*®.....
- III.5.4. BactiCard-*Candida*®.....
- III.5.5. CHROMagar-*Candida*®.....
- III.5.6. MicroScan Rapid Yeast Identification®.....
- III.5.7. Vitek Yeast Biochemical Card®.....
- III.5.8. RapID Yeast Plus System®.....
- III.5.9. Auxacolor®.....
- III.5.10. *Krusei*-color®.....
- III.5.11. Serotipado de *C. albicans*.....
- III.5.12. Diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.....

III.6. COMPARACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS

DE IDENTIFICACIÓN Y EL API ID 32C®

- III.6.1. API ID 32C®- Test de filamentación en suero.....
- III.6.2. API ID 32C®-*Albicans* ID2®.....
- III.6.3. API ID 32C®-BactiCard *Candida*®.....
- III.6.4. API ID 32C®-CHROM*albicans*®.....
- III.6.5. API ID 32C®-CHROMagar *Candida*®.....
- III.6.6. API ID 32C®-MicroScan Rapid Yeast Identification ®.....
- III.6.7. API ID 32C®-Vitek Yeast Biochemical Card ®.....
- III.6.8. API ID 32C®-RapID Yeast Plus System®.....
- III.6.9. API ID 32C®-Auxacolor®.....

III.7. PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y

TIEMPOS VARIABLES

IV. DISCUSION
IV.1. LEVADURAS ENSAYADAS
IV.2. ORIGEN ORGÁNICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO
IV.2.1. Aislados de levaduras en localización vaginal
IV.2.2. Aislados de levaduras en orina
IV.2.3. Aislados de levaduras en uñas
IV.2.4. Aislados de levaduras en hemocultivos
IV.2.5. Aislados de levaduras en catéter
IV.2.6. Aislados de levaduras en muestras respiratorias
IV.3. CULTIVOS MIXTOS
IV.4. MÉTODO DE REFERENCIA: API ID 32C®
IV.5. COMPARACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y EL API ID 32C®
IV.5.1. API ID 32C®- Test de filamentación
IV.5.2. API ID 32C®- <i>Albicans</i> ID2®
IV.5.3. API ID 32C®-Bacticard <i>Candida</i> ®
IV.5.4. API ID 32C®-CHROM <i>albicans</i> ®
IV.5.5. API ID 32C®-CHROMagar <i>Candida</i> ®
IV.5.6. API ID 32C®-MicroScan Rapid Yeast Identification ®
IV.5.7. API ID 32C®-Vitek Yeast Biochemical Card ®
IV.5.8. API ID 32C®-RapID Yeast Plus System®
IV.5.9. API ID 32C®-Auxacolor®
IV.5.10. API ID 32C®- <i>Krusei</i> -color
IV.6. PARÁMETROS COMPARATIVOS ENTRE EL MÉTODO DE REFERENCIA Y LAS DIFERENTES TÉCNICAS
IV.7. SEROTIPADO DE <i>C. ALBICANS</i>
IV.8. <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i>
IV.9. REPRODUCIBILIDAD DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS
IV.10. PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y TIEMPOS VARIABLES

V.- CONCLUSIONES

VI.- BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.-

La relación de los hongos con el hombre se conoce desde antiguo, existiendo numerosas referencias históricas de su faceta negativa, ya sea afectando a los vegetales o animales, de los que el hombre obtiene un beneficio económico, o incluso al propio hombre. Esa relación con los vegetales no fue establecida hasta el siglo XVII, siendo conocida en animales prácticamente dos siglos más tarde, a pesar de lo cual se les considera como organismos patógenos antes que a las bacterias. Los hongos son organismos ubicuos y el hombre se encuentra expuesto a ellos, así factores dependientes del tipo de vida y de las nuevas terapias han provocado una mayor predisposición a las enfermedades fúngicas.

Los avances médicos aparecidos durante la pasada década han mejorado la capacidad preventiva y de diagnóstico de las enfermedades producidas por hongos y, por ello, se dispone además de una relativa oferta terapéutica. Desafortunadamente, ciertas terapias que implican el uso de procedimientos quirúrgicos invasivos y materiales protésicos o de agentes quimioterapéuticos que inducen inmunosupresión severa (como en el caso del tratamiento contra el cáncer y trasplante de órgano) elevan la vulnerabilidad del huésped frente a un amplio espectro de patógenos oportunistas.

Responsables en gran medida de este incremento, son las levaduras, patógenos oportunistas bien conocidos y pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Malassezia* entre otros.

La candidiasis es una infección primaria o secundaria ocasionada por levaduras pertenecientes al género *Candida*. Entre éstas, *Candida albicans* es el agente etiológico con una mayor implicación en estas infecciones, aunque otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* son aisladas con una frecuencia elevada en las muestras clínicas. Además, otras especies, que conocidas, empiezan a ser aisladas como patógenas emergentes a la vez que aparecen otras de nueva descripción.

La identificación de los agentes etiológicos hasta nivel de especie, desempeña un papel muy importante, ya que algunas levaduras y hongos presentan patologías específicas y una resistencia intrínseca a determinados antifúngicos, por lo que se comprueba la existencia de distintos patrones de sensibilidad a los mismos. La irrupción de nuevas especies en la clínica humana hace necesario el desarrollo de métodos rápidos, eficaces y simples para la identificación de levaduras que puedan ser utilizados en la rutina del laboratorio de Microbiología Clínica. Algunos métodos de identificación automatizados comerciales pueden requerir un tiempo demasiado elevado antes de ofrecer el resultado, o ser poco asequibles para laboratorios de tipo medio. En este caso la posibilidad de disponer de un método no automático, rápido, eficaz, con un balance coste/beneficio adecuado y reproducible, que proporcione identificaciones diarias de levaduras, puede ser más adaptable. La identificación presuntiva rápida y segura de estos microorganismos asegura la eliminación de períodos de incubación prolongados y la posterior realización de pruebas adicionales, aportando la ventaja de una reducción del tiempo, manipulación, material y por ello del coste relativo a cada identificación.

Teniendo en cuenta la amplia gama de sistemas de identificación de levaduras introducidas por las distintas compañías comerciales es de gran interés conocer su utilidad, ventajas y desventajas a la hora de elegir por los distintos laboratorios de Microbiología el sistema idóneo en función de sus características y necesidades.

Estas razones nos han llevado a considerar la necesidad de realizar este estudio con los siguientes **objetivos**:

- Profundizar en el estudio de las infecciones fúngicas, fundamentalmente, a nivel hospitalario.
- Determinar la frecuencia de aislamiento de *Candida* spp. según el tipo de muestra estudiada (orina, vagina, uñas, piel, mucosas,...) y el servicio hospitalario de procedencia.

- Conocer diferentes técnicas de identificación de hongos patógenos para elaborar un protocolo de diagnóstico fácil, reproducible y económico para cualquier laboratorio de diagnóstico microbiológico.
- Identificación de *Candida* a nivel de género y especie utilizando diversas técnicas.
- Comparar el método de referencia (API ID 32C®) con las restantes técnicas convencionales y comercializadas para establecer la validez de estas como forma de llegar a seleccionar un método en base a una reducción del tiempo de identificación y en el coste.
- Comparar las distintas técnicas para cada género y especie, con el fin de establecer la existencia de variaciones en función de variables como son género o especie.
- Estudiar la influencia de variables experimentales como son el tiempo y temperatura de incubación sobre el crecimiento de las levaduras procedentes de muestras clínicas.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

I. REVISIÓN Y ANTECEDENTES.-

I.1.- HISTORIA.

La candidiasis, como entidad clínica, ha sido reconocida desde la antigüedad. Hipócrates en su tratado sobre "Epidemias" describió dos casos de afta oral o muguet (placas blancas) en pacientes debilitados, asociados con enfermedades agudas subyacentes, y la presencia de su cuadro clínico ha sido citada durante siglos (Hipócrates). Entre los escritos de Galeno hay numerosas descripciones de afta oral y su frecuente incidencia entre los niños, sobre todo en los enfermizos (Galeno, 130-200 A.D). La enfermedad es mencionada por Samuel Pepys en su diario del 17 de Junio de 1665 (Winner y Hurley, 1964). Rosen von Rosenstein en un texto pediátrico de 1771 (Rosen von Rosenstein, 1771), al igual que Underwood en 1784 (Underwood, 1784), reconoce las condiciones para una candidiasis oral y gastrointestinal. La enfermedad fue tan frecuente en Francia que la Real Sociedad Francesa de Medicina ofreció un premio para su estudio, en 1786, dotado con 1200 libras (Roux y Linossier, 1890). En 1835, Véron postuló que se adquiría durante el paso a través del útero. También, describió los primeros casos de candidiasis esofágica (Véron, 1835).

I.1.1.- PRIMEROS ESTUDIOS.

El descubrimiento inicial del organismo causante de la enfermedad no se hizo hasta 1839, cuando Langenbeck descubrió la "planta criptógama" en una lesión de muguet (Langenbeck, 1839). Describe un hongo en un afta bucal, lo que justificó en forma muy temprana la presencia de un parásito en la enfermedad en el hombre, no asociando la presencia del hongo con las lesiones de la lengua. Aunque erróneamente Langenbeck sugirió que el hongo era el responsable del tifus, su descripción fue una de las primeras en asociar un microorganismo con un proceso patológico.

Las primeras noticias del establecimiento del agente causal con el muguet proceden de Gruby, quien además observó las similitudes de este con otros hongos. El mismo definió la enfermedad y su agente causal en 1842, describiendo al hongo

como "el verdadero muguet de los lactantes" (Gruby, 1842). Pero Berg, en 1846, fue realmente el primer autor en describir la relación entre el hongo de la candidiasis y las lesiones bucales (Berg, 1846). Este autor consideró que el hongo era transmitido por las condiciones antihigiénicas y por los biberones de uso común. Asimismo, se asoció su presencia con enfermedades debilitantes, confirmando algunos comentarios de Hipócrates. Dos años antes, Bennett describió la presencia de un hongo, probablemente, *Candida albicans*, en el esputo y los pulmones de un paciente con neumotórax causado por tuberculosis (Bennett, 1844). Berg reprodujo la misma enfermedad en lactantes sanos, por medio de la inoculación de material de las membranas aftosas. Uno de ellos murió por bronquitis y neumonía causadas por candidiasis (Berg, 1846).

Casi un siglo después de este hallazgo, el hongo de la enfermedad fue objeto de estudios taxonómicos bastante confusos. Mientras algunos autores intentaron cuidadosamente su clasificación dentro de los géneros botánicos ya establecidos, otros aislaban levaduras similares de material clínico procediendo a la asignación de nuevos y conflictivos nombres de género y especie. Gruby incluyó al hongo de Langenbeck en el género *Sporotrichum* en 1842. Bonorden, en 1851, denominando *Monilia Candida* a otro hongo aislado de madera en descomposición (Bonorden, 1815). En 1853, Robin, quien mostró una clara influencia sobre las nuevas generaciones de médicos, reconoció que el hongo del muguet podría convertirse en generalizado, como fase terminal de otras enfermedades (Robin, 1853). Se atribuyó al microorganismo un segundo nombre de *Oidium albicans*, apareciendo por primera vez el uso del epíteto específico *albicans* para las especies. El nombre de este género se debía a la morfología oval de la célula de levadura. Robin describió en detalle las formas tanto de levadura como del micelio del microorganismo. Quinquaud propuso el nombre de *Syringospora robinii* en 1868 (Quinquaud, 1868), mientras Reess en 1877 llamó al hongo *Saccharomyces albicans* (Reess, 1877).

Llamó la atención su naturaleza dimórfica en las descripciones del hongo causante de la candidiasis, hecho reconocido por Bennett en 1844 (Bennett, 1844). Grawitz, en 1877, que incidentalmente llamó al hongo *Micoderma vini*, describió formas de levaduras gemantes y formas miceliares y aún sin nombrarlas,

clamidosporas (Grawitz, 1877). Audrey en 1887 comprobó definitivamente que las diferentes formas morfológicas del hongo correspondían a un solo organismo y que la morfología observada dependía del crecimiento (Audrey, 1887).

I.1.2.- ORIGEN DE LA "MONILIA" Y "MONILIASIS".

El género *Monilia*, introducido inicialmente por Hill en 1751 en la clasificación de algunos hongos aislados de vegetales en descomposición, fue asociado con el hongo causante de la candidiasis al final del siglo XIX. Posteriormente, se comprobó que esta descripción carecía de validez, ya que los microorganismos en realidad pertenecían al género *Aspergillus sp.* El género *Monilia* fue propuesto por Gmelin en 1791 para incluir algunas especies de *Mucor* y *Aspergillus* (Gmelin, 1791). En 1794, Persoon repitió esta descripción y se limitó a decir que los microorganismos eran parecidos a *Aspergillus*. El género *Monilia* como se entiende en la actualidad, fue utilizado por Saccardo en 1886 para incluir algunas especies de hongos aislados de frutas en descomposición (Saccardo, 1886). En la actualidad, éstas se consideran como el estado anamorfo de algunos géneros de ascomicetos, por ejemplo, *Neurospora* y *Clerotinia*, o sea, momias de durazno y de ninguna manera están relacionadas con levaduras del género *Candida*.

Plaut, en 1887, aisló un hongo de tipo levadura de madera en descomposición, con el que pudo obtener lesiones semejantes a la candidiasis oral en las gargantas de pollo (Plaut, 1887). Consideró su aislamiento idéntico a *Monilia albicans*, una especie dimórfica con una historia taxonómica confusa. Llegó a la conclusión de que era el mismo hongo descrito por Hansen y, por consiguiente, era el agente etiológico de muguet de hombre. Este hecho fue aceptado por Zopf, quien en 1890, denominó al hongo *Monilia albicans* (Zopf 1890), nombre que mantuvo durante varias décadas y dio origen al término "Moniliasis" para definir las infecciones propias del hongo causante de la candidiasis, aunque el género *Monilia* existe como género válido para patógenos de plantas no relacionados con *C. albicans*.

En la misma época se produce el descubrimiento de otras formas de candidiasis. Wilkinson (1849) es el primer autor que describió la candidiasis vaginal y su etiología micótica (Wilkinson, 1849) en un paciente, 77 años de edad, que presentaba una secreción vaginal profusa. Wilkinson refirió la imposibilidad de desarrollar los "epífitos" (células de levadura de *Candida*) si no era sobre un "terreno favorable para ellos". Anteriormente, la secreción vaginal, así como el muguet fueron definidos en los libros de texto de medicina como el resultado de secreciones mórbidas. Hausmann demostró en 1875 que el hongo causante de la candidiasis oral y vaginal era el mismo (Hausmann, 1875). Describió la importante relación de la candidiasis vaginal y el muguet del recién nacido, demostrando que la transmisión del hongo a la boca de los lactantes provenía de lesiones en la vagina. También produjo vaginitis en mujeres grávidas sanas tras la inoculación de *Candida* dentro de su vagina. La interrelación de la dermatocandidiasis y el muguet había sido reconocida con anterioridad, en 1771, por Rosen von Rosenstein (Rosen von Rosenstein, 1771), y sus interrelaciones con la infección subcutánea por Virchow en 1850.

Las primeras descripciones completas de otras formas superficiales de candidiasis no aparecerían hasta el comienzo del siglo XX, aunque es probable que la candidiasis cutánea fuera conocida clínicamente mucho antes (Winner y Hurley, 1964). Durante el siglo XIX era bien conocido que las enfermedades debilitantes predisponían a los pacientes a la candidiasis. Trousseau sugirió que la candidiasis oral era una expresión local de una anomalía de todo el sistema (Trousseau, 1869) y Parrot, observando la asociación casi invariable de la enfermedad con un estado de debilidad subyacente, afirmó que la candidiasis es "siempre la consecuencia de un estado mórbido preexistente" (Parrot, 1877).

El primer informe de candidiasis sistémica, en el que se pudo atribuir con entera confianza la identidad del organismo causal con el hongo, se debe a Zenker (Zenker, 1862). En 1861 describió la enfermedad generalizada causada por diseminación hematógena. Su paciente estaba debilitado y tenía muguet bucal, asociación observada muchas veces con anterioridad y en la actualidad en pacientes con SIDA. El paciente de Zenker murió por infección cerebral, sin embargo, se

refirió la presencia de *Candida* en la lesión, indicándose la posible extensión del hongo a otros órganos. En 1870, Parrot describió una enfermedad intestinal y observó la primera infección pulmonar por el hongo en 1877 (Parrot, 1877). Schmorl en 1890 describió una infección diseminada, afectando a varios sistemas orgánicos, por *Candida* (Schmorl, 1890). Las primeras descripciones acreditadas sobre las numerosas formas de candidiasis se relacionan en la Tabla I.

El interés por la candidiasis generalizada y en la endocarditis por *Candida* ha venido incrementándose desde la década de los años cuarenta (Rippon, 1988). La presencia de infecciones por *Candida* como secuela del empleo de antibióticos antibacterianos, en especial de los de amplio espectro, provocó sorprendente aumento de la investigación en este tipo de infecciones. Los resultados ponen de manifiesto el complejo ecosistema al cual pertenece *Candida* y el delicado equilibrio que se establece entre los microorganismos de la flora autóctona. En 1940, Joachim y Polayes, describieron endocarditis por candidiasis como consecuencia de la inyección de heroína por vía parental (Joachim y Polayes, 1940). Casi al mismo tiempo se demostró la asociación entre las infecciones por *Candida* y el tratamiento con esteroides, fármacos inmunosupresores, agentes citotóxicos y defectos del sistema inmune (Winner y Hurley, 1964). En la actualidad, se reconoce a *Candida* como uno de los hongos oportunistas encontrados con mayor frecuencia y se le considera como la causa más común de enfermedades fúngicas graves (Rippon, 1988).

Los trabajos de Castellani sobre micosis por levadura a principio de siglo en la llamada "tos de los catadores de té", en 1912 (Castellani, 1912), fueron una de las primeras aportaciones sobre candidiasis broncopulmonar.

Castellani es el primer investigador en sugerir que otras especies, distintas de *Monilia albicans*, podrían estar involucradas en la patogénesis de la candidiasis. Si bien, se comprobó después que algunas de las nuevas cepas de Castellani eran idénticas a *Candida albicans*, han de atribuirse a este autor las primeras descripciones de las levaduras hoy conocidas como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *C. tropicalis*. Castellani colocaba normalmente sus nuevas especies como

pertenecientes al género *Monilia*, corrigiendo, con resultados aún hoy evidentes, la confusión taxonómica creada en el siglo pasado.

Tabla I. Primeras referencias sobre tipos de candidiasis. Odds (1988).

Candidiasis. Tipo de lesión	Descripción clínica	Autor
Candidiasis oral	400 a. J.C.	Hipócrates
C. esofágica	1835	Véron
C. vaginal	1849	Wilkinson
C. cerebral	1862	Zenker
C. diseminada	1890	Schomorl
Onicomycosis candidiásica	1904	Dubendorfer
C. cutánea	1907	Jacobi
C. mucocutánea crónica	1909	Forbes
Artritis candidiásica	1921	Goldring
Paroniquia candidiásica	1925	Kingery- Thienes
Cistitis candidiásica	1927	Rafin
Osteomielitis candidiásica	1928	Connor
Nefritis candidiásica	1931	Lundquist
Endocarditis candidiásica	1940	Joachim-Polayes
Endoftalmitis candidiásica	1943	Miale

La lista de sinónimos *C. albicans* llega a ser de casi un centenar en la edición de 1984 de "Las levaduras" (Krejer-van Rij, 1984), siendo Berkhout en 1923 quien pone fin a la confusa situación taxonómica. Las especies de *Monilia* médicamente importantes, levaduras anascosporógenas que pueden desarrollar pseudohifas, son claramente diferentes en morfología y fisiología de los mohos de las frutas y hojas en descomposición también llamados *Monilia*. Las normas de la nomenclatura botánica insisten en que debe mantenerse un nombre para el primer organismo descrito, de forma que el uso del término *Monilia* como un género de levadura causante de la candidiasis ha sido invalidado. Berkhout propuso el nombre genérico de "*Candida*" para incluir levaduras asporógenas que tienen "pocas hifas, planas, que cuelgan a un lado en fragmentos más cortos o más largos. Los conidios se desarrollan por gemación en las hifas o entre unos y otros y se caracterizan por ser pequeños e incoloros" (Berkhout, 1923). El término fue adoptado internacionalmente en el Octavo Congreso Botánico de París en 1954 como *nomen conservandum* botánico para el género.

Nuevas especies de levaduras, que posteriormente se comprobaron como idénticas a especies de *Candida* ya establecidas, se siguen describiendo con frecuencia, si bien ninguna haya sido asignada al género *Monilia* desde 1940. Meyer y col. (1984) y Barnett y col. (1983) han listado un número elevado de sinónimos para *C. albicans* –110 166, respectivamente, poniendo en evidencia la dificultad que conlleva una clasificación correcta de estas especies.

Los términos "*Monilia*" y "*moniliasis*" aparecen todavía, ocasionalmente, en la bibliografía ya que la Asociación Médica Americana abandonó finalmente "*moniliasis*" en el Index Medicus en 1981 y se espera que al comienzo del siglo XXI, setenta y siete años después de la introducción del género *Candida*, el término "*moniliasis*" se siga consignando en la historia médica junto con denominaciones arcaicas como *tisis* y otras afines.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

I.2.- SITUACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *CANDIDA*.

I.2.1.- CONCEPTOS TAXONÓMICOS ACTUALES.

No existen criterios estáticos acerca de la taxonomía y, entre un grupo de microorganismos, como son las levaduras, con una asombrosa variedad de propiedades fisiológicas a pesar de morfologías similares engañosas, aún los nombres de géneros y especies bien conocidos pueden cambiar al descubrirse nuevas características.

Las levaduras pueden definirse en términos amplios, como hongos con morfología predominante unicelular. Esta definición es aplicable a los miembros del género *Candida*, así como a cualquiera de los géneros clásicos tales como *Saccharomyces*. Así, la expresión hongos levaduriformes, usada frecuentemente para describir las especies patógenas de *Candida*, es incorrecta e innecesaria. La descripción generalizada que definen a las especies patogénicas del género *Candida* como “hongos de aspecto de levadura” es arcaica, por haber diferencias importantes con las otras levaduras. El género *Candida* comprende más de 150 especies, donde la principal característica es la ausencia de alguna forma sexual (Odds, 1988).

Muchas levaduras pueden producir esporas sexuales (ascosporas y basidiosporas) bajo condiciones ambientales apropiadas, guardando estas levaduras una clara relación taxonómica con los hongos ascomycetes y basidiomycetes. En otros casos, el estado sexual no ha sido aún descrito y su relación con otros hongos no está suficientemente definida y por lo que son clasificadas dentro de las levaduras imperfectas o deuteromycetes.

Las hifas podrían, de morfología muy diversa, estar presentes; siendo comunes cadenas de células (pseudomicelio). La prevalencia del crecimiento unicelular es conocido en *Endomycetes* y en *Heterobasidiomycetes*.

El género *Candida* en la clasificación de Lodder, se describe como un conjunto heterogéneo de levaduras que no reúne suficientes cualidades para ser clasificadas en otros géneros más homogéneos que el de levaduras imperfectas.

I.2.2.- SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS.

I.2.2.1.- Clasificación de Kreger-van Rij.

Kreger-van Rij define una levadura como un hongo unicelular que se reproduce por gemación o fisión. Las células gemantes de levadura podrían ser características de un estado particular en el ciclo de vida de los hongos multicelulares (Kreger-van Rij, 1984). El sistema de clasificación dado por Kreger-van Rij (1984) se muestra en la tabla II.

**Tabla II. Clasificación de las levaduras en el Reino Eumycota
(Kreger-van Rij, 1984)**

Subdivisión Ascomycotina

Subclase Hemiascomycetes

Orden Endomicetales

Subdivisión Basidiomycotina

Orden Ustilaginales

Orden Tremellales

Subdivisión Deuteromycotina (levaduras imperfectas)

Subclase Blastomycetes

I.2.2.2.- Clasificación de Hoog y Guarro.

Estos autores reconocen seis divisiones fúngicas, donde las cuatro primeras (Myxomycota, Chytridiomycota, Oomycota y Zygomycota) están consideradas como los más simples evolutivamente, sin micelio septado, mientras que los Ascomycota y Basidiomycota se engloban dentro de hongos superiores con micelio septado, y además los hongos anamórficos (Hoog y Guarro, 1995). Tabla III.

Los hongos anamórficos son definidos por estos autores como hongos con hifas de reproducción asexual y estado teleomorfo no conocido. Se supone para la mayoría de ellos la existencia de un estado teleomorfo en Ascomycota y unos pocos pertenecen a Basidiomycota. Debido a la ausencia del estado teleomorfo, la taxonomía se establece por características ultraestructurales. Los hongos anamórficos se clasifican artificialmente acorde a su forma y a la producción de cuerpos fructíferos asexuales (Hoog y Guarro, 1995; Guarro y cols., 1999).

Tabla III. Clasificación de Hoog y Guarro. (Hoog y Guarro, 1995).

División Myxomycota

División Chytridiomycota

División Oomycota

División Zygomycota

Orden Mucorales

Orden Entomophthorales

División Ascomycota

Clase Endomycetes

Familia Saccharomycetaceae

Issatchenkia orientalis..... *C. krusei*

Saccharomyces cerevisiae

Familia Endomycetaceae

Debaryomyces hansenii *C. famata*

Hansenula anomala *C. pelliculosa*

Pichia guilliermondii..... *C. guilliermondii*

Pichia norvegensis *C. norvegensis*

Stephanoascus ciferri *C. ciferri*

Familia Dipodascaceae

Clavispora lusitaniae *C. lusitaniae*

Familia Lipomycetaceae

Kluyveromyces marxianus.... *C. kefir*

Clase Euscomycetes

División Basidiomycota

Clase Heterobasidiomycetes

Clase Holobasidiomycetes

Hongos anamórficos

Levaduras

Hyphomycetes

Coelomycetes

I.2.2.3.- Clasificación de Dixon, Rhodes y Fromtling.

El concepto de levadura puede se refiere a una célula que se reproduce por germinación, proceso por el cual la célula progenitora oprime una porción de sí misma para producir una célula progenie (Dixon y cols., 1999). Las levaduras son generalmente unicelulares y forman colonias circulares, restringidas o mucoides; en contraste con los mohos que son multicelulares, de formas filamentosas como hebras denominadas hifas. Estas se entrelazan para formar una estructura a modo de esterilla, denominada micelio, resultando colonias que son descritas coloquialmente como “peludas”.

El término levadura no engloba a ningún taxón formal; y su concepto es utilizado de forma variable por los micólogos. Algunos autores restringen este término a un grupo específico de Ascomycetes que producen ascosporas en ascas libres, unicelulares y se reproducen asexualmente por germinación o fisión (Dixon y cols., 1999). En la tabla IV se incluyen los principales grupos taxonómicos del Reino de los hongos (Myceteae), en los que se encuentran clasificados médicamente los hongos de mayor relevancia.

Tabla IV. Reino Myceteae. (Dixon y cols., 1999).

Designación taxonómica
Phylum Zygomycota
Clase Zygomycetes
Orden Mucorales
Orden Entomophthorales
Phylum Ascomycota
Clase Ascomycetes
Orden Saccharomyces
Orden Onygenales
Orden Eurotiales
Orden Microascales
Orden Pyrenomycetes
Clase Archiascomycetes
Orden Pneumocystidales
Phylum Basidiomycota
Clase Basidiomycetes
Orden Agaricales
Orden Tremellales
Grupo forma o Phylum Deuteromycota
Clase Deuteromycetes
Orden Cryptococcales
Orden Moniliales
Orden Sphaeropsidales

I.2.3.- CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS IMPERFECTAS.

Este grupo de hongos incluye levaduras cuyo estado perfecto no ha sido descrito. Este estado puede incluir ascos o basidios. Las levaduras pueden ser heterotálicas haploides, en los que no se han encontrado los tipos de acoplamiento, o también, levaduras haploides o diploides cuyas condiciones de esporulación son desconocidas. Es de esperar que todas las especies imperfectas desaparezcan a medida que se encuentren los estados perfectos. Afortunadamente, la revisión de 1983 del Código Internacional de Nomenclatura Botánica permite continuar con el uso de la terminología anamorfa (forma asexual) para las especies, aún cuando haya sido descrita la forma teleomorfa (forma sexual) (Voss y cols., 1983).

Las formas sexuales han sido descritas para tres de las principales especies patógenas de *Candida* y para tres de las levaduras comúnmente encontradas en material clínico (Barnett y cols., 1990; Meyer y cols., 1984) (Tabla V). En la clasificación actual de las levaduras imperfectas, algunos grupos pequeños están caracterizados por una sola propiedad morfológica o por una combinación de propiedades aisladas, morfológicas y fisiológicas y hay un resto amplio que se incluye en el género *Candida*.

Según la clasificación de Kreger-van Rij las levaduras imperfectas se encuentran representadas en dos familias: *Sporobolomycetae*, que se distingue por la formación de balistosporas, y *Cryptococcaceae*, donde quedan incluidos todos los demás géneros, si bien su heterogeneidad hace que la clasificación sea algo irreal. A su vez, la *Sporobolomycetae* incluye dos géneros y la *Cryptococcaceae* diversas especies de levaduras clasificadas en quince géneros, siete de los cuales son monoespecíficos (Tabla VI).

Dixon y colaboradores (Dixon y cols., 1999) coinciden en definir las levaduras imperfectas dentro del Orden Cryptococcales, pero para estos autores los géneros más representativos son los que se muestran en la tabla VII.

Tabla V. Nombres de los estados perfectos de las especies de *Candida* en material clínico (Barnett y cols., 1990; Meyer y cols., 1984)

Forma asexual	Forma sexual
<i>Candida famata</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Candida guilliermondii</i> (var. <i>guilliermondii</i>)	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Candida guilliermondii</i> (var. <i>membranaefaciens</i>)	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>

TABLA VI. Clasificación de las levaduras imperfectas (Kreger-van Rij, 1984)

Familia Cryptococcaceae

Géneros: Aciculoconidium

Brettanomyces

Candida

Cryptococcus

Kloeckera

Malassezia

Oosporidium

Phaffia

Rhodotorula

Sarcinosporom

Schizoblastosporion

Sterigmatomyces

Sympodyomices

Trichosporon

Trigonopsis

Familia Sporobolomycetacea

Géneros: Bullera

Sporobolomyces



Tabla VII. Levaduras imperfectas. (Dixon y cols., 1999).

Forma Grupo Deuteromycota
Clase Deuteromycetes
Orden Cryptococcales
Levaduras imperfectas: <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> ,
<i>Trichosporon</i> , <i>Malassezia</i>

I.2.4- ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA*.

I.2.4.1.- Clasificación del Género *Candida*.

Tras los múltiples cambios que ha sufrido el género *Candida*, la clasificación más aceptada universalmente es la de Lodder, revisada por Kreger-van Rij (1984). Esta clasificación incluye 196 especies, de las que solo hacemos referencia en nuestro estudio a las de interés en clínica humana.

I.2.4.2.- Especies del género *Candida* de interés en clínica humana.

Las levaduras del género *Candida* tienen una amplia distribución en la naturaleza, encontrándose en casi todos los hábitats terrestres y acuáticos. Sin embargo, las conocidas como principales responsables de candidiasis humanas tienen una distribución mucho más restringida y se encuentran frecuentemente asociadas al hombre y a otros animales homeotermos. De las especies descritas no llegan a 20 las asociadas en alguna ocasión con el hombre. De ellas, la mayoría de los autores coinciden en designar como los principales agentes etiológicos de enfermedad a las especies como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (sin *C. pseudotropicalis*), *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. viswanathii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis*.

I.2.5.- EVOLUCIÓN DE LA NOMENCLATURA.

Las denominaciones en uso de género y/o especie pueden ser cambiadas por diversas razones, entre las que suelen figurar los criterios poco objetivos como son una deficiente aplicación, al no estar los tipos bien definidos; o bien el desconocimiento de descripciones taxonómicas previas entre otros. Por esa razón, han existido cambios como el de la especie *Torulopsis glabrata* que pasó a denominarse *Candida glabrata* (Yarrow y Meyer, 1978; Barnett y cols., 1983; Odds y cols., 1997), puesto que después de muchas opiniones en contra de diferentes investigadores, van Uden y Vidal Leira (Lodder, 1970) afirmaban que, aunque se siga utilizando el nombre de *Torulopsis*, éste se distingue de *Candida* por un criterio diagnóstico intergenérico totalmente inadecuado: a, saber, la capacidad de las especies de *Candida* para formar pseudohifas. Otras especies fueron consideradas sinónimas por presentar relaciones genéticas significativas, como *Candida pseudotropicalis* o *Candida kefir* (Stenderup y Back, 1968). Asimismo, utilizando técnicas de análisis de DNA, como es el “fingerprinting” (Sullivan y col, 1996) se ha confirmado que la especie *C. stellatoidea* es sinónimo de *C. albicans*.

I.2.5.1.- Nuevas especies: *Candida albicans* → *Candida dubliniensis*.

Dadas las ambigüedades en la taxonomía de *Candida* y en los métodos mejorados de aislamiento, identificación, diferenciación y clasificación, se ha podido identificar a nuevas especies asociadas con la candidiasis recientemente. La nueva especie, establecida en 1995 como *C. dubliniensis* por Sullivan y colaboradores, está asociada con casos de candidiasis oral en pacientes infectados con VIH (Sullivan y cols., 1995, 1996, 1997; Coleman y cols., 1997; Moran y cols., 1997; Bikandi y cols., 1998; Kirkpatrick y cols., 1998; Meiller y cols., 1999; Pincus y cols., 1999; Schorling y cols., 2000). Este hecho, sugiere la relación entre la aparición de esta especie como patógeno humano y la selección causada por el uso del fluconazol en el tratamiento de infecciones en estos pacientes (Moran y cols., 1997; Kirkpatrick y cols., 1998; Moran y cols., 1998; Pfaller y cols., 1999; Sullivan y cols., 1999; Quindós y cols., 1999). Por otro lado, también se ha podido aislar esta nueva especie en pacientes con diabetes mellitus dependientes de insulina (Willis y cols., 2000).

Inicialmente, los aislamientos de *C. dubliniensis* fueron identificados como *C. albicans* al identificarse la formaban tubos germinativos y clamidosporas (Coleman y cols., 1993; Sullivan y cols., 1993). De cualquier forma, la producción de clamidosporas en *C. dubliniensis* difiere de *C. albicans* en que se aparecen en mayor número y en pares contiguos, raramente vistas de esta forma en *C. albicans*. Por otro lado, ambas especies producen blastoconidios con pseudohifas, verdaderas hifas. Ambas crecen bien a 37 °C, pero esta nueva especie crece muy lentamente o no crece a 42 °C (Sullivan y cols., 1995; Sullivan y Coleman, 1997; Pinjon y cols., 1998; Tintelnot y cols., 2000). Las dos especies también difieren significativamente en la asimilación de carbohidratos específicos (Coleman y cols., 1993; Sullivan y cols., 1995; Sullivan y cols., 1997, 1993). Los aislamientos de *C. dubliniensis* desarrollan un fenotipo estable resistente al fluconazol cuando se exponen a este agente antifúngico *in vitro* (Moran y cols., 1997). Las colonias de las dos especies son morfológicamente idénticas cuando crecen en medios convencionales como el agar de Sabouraud, pero son distinguibles al crecer en sustratos cromogénicos como el CHROMagar *Candida*, mostrando las colonias de *C. dubliniensis* un verde más oscuro que las de *C. albicans* (Odds y Bernaerts, 1994; Coleman y cols., 1997; Sullivan y cols., 1997; Velegraki y Logotheti, 1998; Jabra-Rizk y cols., 1999; Tintelnot y cols., 2000). Todos los aislamientos de *C. dubliniensis* examinados no presentan serotipo A (Sullivan y cols., 1995, 1997; Coleman y cols., 1997). Las colonias de *C. dubliniensis* también pueden ser diferenciadas de las colonias de *C. albicans* por la ausencia de colonias fluorescentes en agar de Sabouraud de azul de metil bajo luz ultravioleta (Schoofs y cols., 1997). Otra característica fenotípica específica para *C. dubliniensis* es un resultado negativo en las pruebas para la actividad β -glucosidasa intracelular (Boerlin y cols., 1995; Schoofs y cols., 1997; Sullivan y cols., 1995; Tintelnot y cols., 2000). A este respecto, en el trabajo de Pincus y colaboradores (Pincus y cols., 1999) se estudian las diferencias existentes entre ambas especies en la asimilación de metil- α -D-glucósido (MDG), D-trehalosa (TRE) y D-xilosa (XYL) empleando el procedimiento de Wickerham y Burton (Wickerham y Burton, 1948); concluyéndose, esencialmente, con idénticos resultados para ambas especies, no obstante siguiente a una incubación prolongada. Entonces, es la rapidez de la asimilación alcanzada con los sistemas de identificación

comerciales lo que permite la diferenciación de *C. dubliniensis* de *C. albicans* (Gales y cols., 1999).

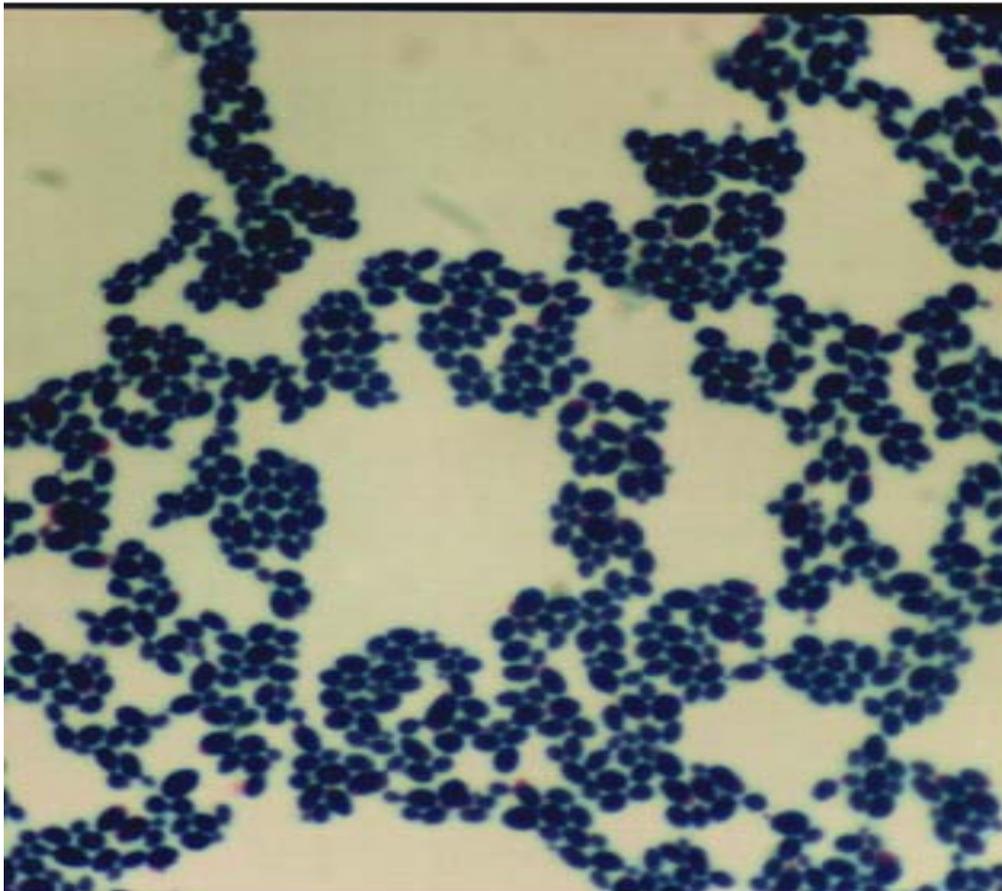
Aunque no hay claras diferencias fenotípicas entre ambas especies, es sólo al compararlas genotípicamente cuando se evidencian las verdaderas diferencias (Coleman y cols., 1997; Pfaller y cols., 1998; Joly y cols., 1999; Staib y cols., 2000). La primera indicación de las diferencias en las colonias de *C. dubliniensis* resultó al hacer la prueba de DNA fingerprinting sonda 27 A (Scherer y Stevens, 1988; Coleman y cols., 1993; Sullivan y cols., 1993; Sullivan y cols., 1995; Quindós y cols., 1999). Asimismo pruebas moleculares como el RAPD y la cariotipificación han permitido la detección de esta especie antes desconocida y proveen una herramienta útil para la exacta tipificación de aislamientos con características fenotípicas particulares (Rodero y cols., 1998).

I.3.- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS GENERALES DEL GÉNERO *CANDIDA*.

Las células del género *Candida* se caracterizan por tener un tamaño de 2 a 4 μm , de forma variada incluyendo formas globosas, ovoides, cilíndricas, alargadas, raramente puntiagudas, ojivales, o en forma de botella. La reproducción se realiza, normalmente, por yemas multilaterales y presentan un pseudomicelio bien desarrollado, rudimentario o ausente. En algunas especies aparece un micelio verdadero, diferencia con respecto al género *Torulopsis* que no forma ni pseudohifas ni hifas. La existencia de verdaderas hifas septadas, que aparecen bajo ciertas circunstancias en algunas levaduras, podría estar asociada con la reducción de oxígeno (Warren y Hazen, 1999). Pueden presentarse clamidosporas, no así ascosporas, teliosporas, balistosporas y artrosporas. No existe pigmentación visible dada la ausencia de pigmentos carotenoides, lo que es fácil establecer una clara diferencia con respecto al género *Rhodotorula*. Pueden formar polisacáridos extracelulares, los cuales dan coloración verde a púrpura al reaccionar con el yodo. La asimilación del inositol es variable. Las cepas inositol positivas forman pseudomicelios. La fermentación de azúcares puede darse o no.

Fotografía 1. Morfología de las especies del género *Candida*.

Tinción de Gram (x1000)



I.4.- CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA* CON INTERÉS EN CLÍNICA HUMANA.

I.4.1.- *Candida albicans* (Robin) Berkhout 1923.

Sinonimia: *Oidium albicans* Robin 1853; *Monilia albicans* (Robin) Zopf 1890; *Syringospora robinii* Quinquaud 1869; *Endomyces pinoyi* Castellani 1912; *Mycotoruloides triadis* Langeron y Talice 1932; *Candida genitalis* Batista y Silveria 1962; *Candida intestinalis* Batista y Silveria 1959; Kreger-van Rij pone en lista 90 sinónimos. En 1842, Gruby al describir el microorganismo lo llamó *Sporotrichum spp.*

Candida albicans aparece, normalmente, como un comensal de las membranas mucosas y en el tracto digestivo de humanos y animales. Corresponde a más del 70% de las especies aisladas de *Candida* de lugares de infección y se le considera como el agente causal de todos los tipos de candidiasis. Los aislamientos ambientales son de orígenes contaminados, en su mayoría, por humanos o excrementos de animales, como el agua contaminada, suelo, aire y plantas (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994). La apariencia macroscópica es de colonias de color blanco a crema, redondas, con bordes regulares y centro algo prominente, de aspecto brillante o céreo y superficie lisa y húmeda. Su consistencia es cremosa. Las células presentan una morfología microscópica, normalmente, esférica o subesférica; y, a veces, fuertemente ovales (2.0-7.0 x 3.0-8.5 µm). Se presentan aisladas por lo general, o gemando, en cadenas cortas y en racimos.

Al ser cultivadas en medio de patata-zanahoria-bilis (PZB), desarrollan un pseudomicelio abundante y puede formarse un verdadero micelio. El pseudomicelio tiene, generalmente, blastosporas redondeadas o ligeramente ovaladas formando racimos que se distribuyen a lo largo de las pseudohifas. También se observan numerosas clamidosporas unicelulares. La tinción con tinta de India, revela la ausencia de cápsula.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Positivo dentro de 3 horas

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en medio de cicloheximida (actidiona)....Positivo

Crecimiento a 37 °CPositivo

Reacciones de fermentación: la fermentación se observa con la producción de gas y es independiente de los cambios de pH.

Gluc	Lac	Mal	Sac	Gal	Tre	Raf	Mel
+	-	+	- (+)	v	v	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	v	Ribitol	v
Sacarosa	+ (-)	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	v
Celobiosa	-	D-ribosa	-	D-arabinosa	v
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	v	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	v	Insulina	v

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

Estado teleomorfo: Aún se desconoce, pero se ha propuesto que *Syringospora* con afinidades a los Basidiomycetes, podría ser la fase teleomorfa, aunque no se ha comprobado (Rippon, 1988).

I.4.2.- *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout, 1923.

Sinonimia: *Oidium tropicalis* Castellani 1910; *Endomyces tropicalis* Castellani 1911; *Monilia tropicalis* Castellani y Chalmers 1913; *Candida vulgaris* Berkhout 1923; *Mycotorula japonicum* Yamaguchi 1943; *Trichosporon lodderi* Phaff, Mrak y William 1952; *Mycotorula dimorpha* Redaelli y Ciferri 1935; Kreger-van Rij pone en lista 57 sinónimos.

Candida tropicalis es una de las principales causas de septicemia y candidiasis diseminada, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes. Es el segundo patógeno médico más frecuentemente encontrado, próximo a *C. albicans*, y se encuentra formando parte de la flora normal mucocutánea. Variantes de *C. tropicalis* sacarosa negativa se han encontrado en aumento en casos de candidiasis diseminada. Se han efectuado aislamientos ambientales en heces, suelo y langostín (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

C. tropicalis desarrolla colonias de color blanco a crema o blanco grisáceo mate, blandas, de superficie lisa y cremosa o plegada y resistente. Presentan un borde micelial bien definido. La morfología microscópica hace referencia a células globosas, poco o muy ovaladas (3.0-5.5 x 4.0-9.0 μm), sin cápsula. En medios de cultivo líquidos se forma una película delgada que puede tener atrapadas burbujas de gas. En PZB forma un pseudomicelio abundante. Las pseudohifas de *C. tropicalis* portan blastosporas simples en cadenas cortas o en racimos. Algunas cepas de *C. tropicalis* producen clamidoconidios, sobretodo en el aislamiento inicial. Estos difieren un poco de los de *C. albicans*, y tan solo no suelen tener célula de sostén. La producción de estos conidios cesa en el subcultivo, mientras que esta es una característica constante de *C. albicans* (Rippon, 1988).

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Positivo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación: Fermentación positiva es producción de gas y es independiente de los cambios de pH.

Glu	Lac	Mal	Sac	Gal	Tre	Raf	Mel
+	-	+	v	+	+(D)	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	v	Ribitol	v
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	v(D)
Celobiosa	v	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	v(D)	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

I.4.3.- *Candida kefyr* (Beijerinck) van Uden y Buckley, 1970.

Sinonimia: *Candida pseudotropicalis* (Castellani) Basgal

Candida kefyr se asocia normalmente con manifestaciones cutáneas superficiales más que con infecciones sistémicas. Se ha aislado de uñas y de infecciones pulmonares. Se han descrito aislamientos medioambientales a partir de derivados lácteos (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

Las colonias tienen un color crema amarillento, semimate son blandas y de una superficie lisa o finamente reticulada. Al microscopio, las células son poco o muy ovaladas (3-6.5 x 5.5-11 μm), algunas veces aparecen células más alargadas de más de 16 μm . Al ser cultivadas en PZB, en algunas cepas el pseudomicelio es abundante, si bien ésta no es una característica general. El pseudomicelio está formado por ramas de pseudohifas que portan cadenas de blastosporas, que frecuentemente adoptan una posición vertical. En otras partes pueden presentarse células elongadas, desnudas y ondulantes.

Preparación de tinta de India, negativa, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Positivo

Crecimiento a 37 °C.....Variable

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	+	-	+	v	v	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	+	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	-	Ribitol	-
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	v
Maltosa	-	D-xilosa	v	L-arabinosa	v
Celobiosa	v	D-ribosa	v	D-arabinosa	-
Trehalosa	v	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	+	L-sorbosa	v	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	v	Insulina	v

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

I.4.4.- *Candida guilliermondii* (Castellani), Langeron y Guerra, 1938.

Sinonimia: *Endomyces guilliermondii* Castellani 1912; *Monilia guilliermondii* Castellani y Chalmers 1913; *Myzeloblastanon guilliermondii* Ota 1928; *Blastodendrion guilliermondii* Guerra 1935; *Castellania guilliermondii* Dodge 1935; *Monilia pseudoguilliermondii* Castellani y Chalmers 1919; *Castellania pseudoguilliermondii* Dodge 1935; *Torula fermentati* Saito 1922; *Myzeloblastanon arzti* Ota 1924; *Myzeloblastanon krausi* Ota 1924; *Blastodendrion krausi* Ciferri y Redaelli 1929; *Mycotorula krausi* Redaelli y Ciferri 1947; *Microanthomyces alpinus* Gruss 1926; *Candida melibiosi* Lodder y Kreger-van Rij 1952; *Trichosporon appendiculare* Batista y Silveria 1959.

Candida guilliermondii ha sido aislada de numerosas infecciones humanas, mayoritariamente de origen cutáneo. Si bien las infecciones sistémicas son poco frecuentes, hay antecedentes de un paciente con anemia aplásica. *C. guilliermondii* también se aísla de piel normal, agua de mar, heces de animales, suero de manteca, cuero, avispas de higueras, pescado y cerveza (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

La apariencia macroscópica es de colonias de color blanco amarillento, blandas, brillantes y lisas, o bien, opacas y plegadas. Al microscopio, células poco ovaladas (2-4,5 x 2,5-7 μm); a veces, aparecen pequeñas células cilíndricas. En la superficie de medios de cultivo líquido pueden formar un anillo e islotes (Rippon, 1988). En PZB, el pseudomicelio es diferente según las cepas. Algunas de éstas presentan un desarrollo micelial esparcido, formado por cadenas ramificadas de células. Otras muestran crecimiento extensivo. Blastosporas agrupadas en forma de racimo de uvas a lo largo de las pseudohifas, o también, suelen observar pseudohifas ramificadas con blastosporas ovoides.

Preparación de tinta de India, negativa, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento de cicloheximida.....Positivo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	v	-	+	-	+	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	+	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	+	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	+
Celobiosa	+	D-ribosa	v(D)	D-arabinosa	+
Trehalosa	+	L-ramnosa	v(D)	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	v	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	+	Glicerol	+	Insulina	+

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

Estado teleomorfo: Las cepas que se aparean son *Pichia guilliermondii*. Muchas no se aparean.

I.4.5.- *Candida krusei* (Castellani), Berkhout, 1923.

Sinonimia: *Saccharomyces krusei* Castellani 1910; *Endomyces krusei* Castellani 1912; *Monilia krusei* Castellani y Chalmers 1913; *Myceloblastanon krusei* Ota 1928; *Trichosporon krusei* Ciferri y Redaelli 1935; *Mycotoruloides krusei* Langeron y Guerra 1935; *Monilia parakrusei* Castellani y Chalmers 1919; *Castellania parakrusei* Dodge 1935; *Mycodermia chevalieri* Guilliermond 1914; *Candida chevalieri* Westerdijk 1933; *Mycoderma monosia* Anderson 1917; *Mycoderma bordetii* Kuff 1920; *Monilia inexpectata* Mazza 1930; *Mycocandida inexpectata* Talice y Mackinnon 1934; *Pseudomonilia inexpectata* Dodge 1935; *Trichosporon dendriticum* Ciferri y Redaelli 1935; *Candida dendritica* Dodge y Moore 1936; *Monilia krusoides* Castellani 1937; *Pseudomycoderma miso* Mogi 1940; *Candida castellani* van Uden y Assis-López 1953; *Candida tamarindi* Lewis y Johar 1955; *Procandida tamarindi* Novak y Zolt 1961; *Candida lobata* Batista y Silveria 1959.

C. krusei normalmente aparece asociada con algunas formas de diarrea infantil y, ocasionalmente, con infecciones sistémicas. Se ha podido encontrar colonizando los tractos gastrointestinal, respiratorio y urinario de pacientes con granulocitopenia. Los aislamientos ambientales se han realizado de la cerveza, derivados lácteos, piel, encurtidos, heces de animales y aves (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994). Las colonias son de color blanco, opacas, blandas, de superficie lisa con algunos pliegues y un margen irregular bordeado con pseudomicelios. La morfología microscópica de células ovoides, elongadas y cilíndricas, predominantemente pequeñas, (2,2-5,6 x 4,3-5,2 μm); aparecen aisladas gemando y en cadena. Se observan también células largas, algunas curvadas. *C. krusei* desarrolla una película gruesa a través del caldo y sube por un lado del tubo (Rippon, 1988). En PZB, pseudomicelio extendido consistente en cadenas de células elongadas, a veces, tenue, frecuentemente ramificado. Las blastosporas aparecen en racimos y cadenas a lo largo de las pseudohifas.

Preparación de tinta de India, negativa, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Variable

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Negativo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	-	-	-	-	-	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	-	Melecitosa	-	Ribitol	-
Sacarosa	-	Almidón	-	D-manitol	-
Maltosa	-	D-xilosa	-	L-arabinosa	-
Celobiosa	-	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	-	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	-	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

I.4.6.- *Candida parapsilosis* (Ashford), Langeron y Talice, 1959.

Sinonimia: *Monilia parapsilosis* Ashford 1928; *Mycocandida parapsilosis* Dodge 1935; *Monilia onychophila* Pollicci y Nannizzi 1926; *Myconcandida onychophila* Langeron y Talice 1932; *Blastodendrion intestinale* Mattlet 1941; *Blastodendrion globosum* Zach 1933; *Blastodendrion gracile* Zach 1933; *Schizoblastoporion gracile* Dodge 1935.

C. parapsilosis es un patógeno humano oportunista que puede causar infecciones cutáneas superficiales, especialmente en uñas así como infecciones sistémicas. Los aislamientos ambientales se han realizado a partir de aguas intersticiales y oceánicas, carnes curadas, aceitunas y piel normal y heces (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

Desarrolla colonias de color amarillento, brillantes y blandas y en la mayoría de las especies son de superficie lisa, mientras en algunas están parcial o profundamente plegadas. La morfología microscópica de células es predominantemente, pequeña, oval, elíptica y elongada (2,0-3,5 x 3,0-4,5 µm) que aparecen aisladas, en parejas, en cadenas cortas y en racimos. En PZB, el

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

pseudomicelio está formado por cadenas de células elongadas con cadenas y racimos de blastosporas redondas u ovals, distribuidas a intervalos a lo largo de las pseudohifas. Un número muy reducido de cepas no forman pseudomicelio

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Negativo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	v	-(+)	-(+)	-	-	-(+)	-

Asimilación de azúcares:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	-	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	-	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	+
Celobiosa	-	D-ribosa	v(D)	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

Estado teleomorfo: *Lodderomyces elongisporus*. Por lo regular, se encuentra en uñas y en endocarditis.

I.4.7.- *Candida zeylanoides* (Castellani), Langeron y Guerra, 1938.

La apariencia macroscópica de colonias es de color crema a amarillo, opaca, blanda y untuosa. Superficie lisa y plana. Al microscopio, las células son poco o muy ovoideas (3-5,8 x 5-10,8 μm) y se presentan aisladas, en parejas y en cadenas cortas. Pueden observarse también muchas células elongadas. En PZB, el pseudomicelio está formado por cadenas de células, frecuentemente curvadas, llevando blastosporas redondas, ovales o elongadas, tanto aisladas en cadenas cortas y en racimos. El mayor desarrollo de blastosporas aparece en los extremos terminales de los filamentos de pseudohifas.

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
-(+)	-	-	-	-	-	-(+)	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	v	Melecitosa	-	Ribitol	v
Sacarosa	-	Almidón	-	D-manitol	+
Maltosa	-	D-xilosa	-	L-arabinosa	+
Celobiosa	v	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	-	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

I.4.8.- *Candida glabrata* (Anderson), Yarrow y Meyer, 1978.

Sinonimia: *Torulopsis glabrata* (Anderson) Lodder y de Vries.

Candida (Torulopsis) glabrata es un miembro de la familia *Cryptococcaceae*, es una levadura anamórfica, no filamentosa, que inhibe el tracto gastrointestinal y genitourinario de los humanos y animales. Es una de las levaduras más común en la superficie corporal, siendo aislada a menudo de la piel y orina (Ahearn, 1974; Ahearn y Jannach y col,1966). Ha sido implicada como agente etiológico “oportunista” de infecciones superficiales y sistémicas, especialmente, en huéspedes inmunocomprometidos. Se le considera como un saprobio al ser frecuentemente aislada de piel, boca, vagina, inodoros. Ha sido el agente etiológico sospechoso en infecciones como septicemia, pielonefritis, meningitis, endocarditis, colecistitis, osteomielitis, espondilitis, hiperplasia, infecciones pulmonares, hiperalimentación e infección de la cavidad oral, y fungemia (Minkowitz y Koffler, y cols., 1963; Newman y Hogg, 1969; Oldfield y Kapica, y cols., 1968; Heffner y Franklin, 1978; Lees y Rau, y cols., 1971; Wickerham, 1957; Rodríguez y Shinya, y cols., 1971; Anhalt y cols., 1986; Bruns y cols., 1986; Carmody y Kane, 1986; Gustke y Wu,

1981; Hase y cols., 1976; Paige y cols., 1987; Stinnot y cols., 1987; Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

Las colonias son de color blanco o crema, blancas y con superficie lustrosa y plana. Las células son ovoides (2,0-4,0 x 3,0-5,5 μm), con yemas multilaterales. En medios de cultivo líquidos pueden formar un pequeño anillo, película y sedimento (Rippon, 1988). En PZB no se forman pseudomicelios y algunas cepas pueden formar cadenas (pocas) ramificadas, de células ovoides.

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Negativo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	-	-	-	-	-	v	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	-	Melecitosa	-	Ribitol	-
Sacarosa	-	Almidón	+	D-manitol	-
Maltosa	-	D-xilosa	-	L-arabinosa	-
Celobiosa	-	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	v	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	v	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

Presenta la habilidad de asimilar la trehalosa en presencia de cicloheximida en el período de una hora, cuando es incubada a 37 °C (Stockman y Roberts, 1985).

I.4.9.- *Candida famata* (Harrison) Meyer y Yarrow, (Harrison, 1928).

Sinonimia: *Torulopsis candida* (Saito) Lodder.

C. famata es un aislamiento ambiental común, de cualquier forma es muy raro recuperarlo de muestras clínicas, normalmente asociadas con piel (Ellis y cols., 1992; Ellis, 1994).

Las colonias son de color blanco a crema, de superficie lisa y microscópicamente son células ovoides (2-3,5 x 3,5-5 µm). No producen pseudohifas.

Preparación de tinta de India, negativa, no presenta cápsulas.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Variable

Crecimiento a 37 °C.....Variable

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
v	-	v	v	-	+	v	+

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	+	Eritritol	v
Galactosa	+	Melecitosa	+	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	+
Celobiosa	+	D-ribosa	v	D-arabinosa	v
Trehalosa	+	L-ramnosa	v	Inositol	-
Lactosa	v	L-sorbosa	v	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	v	Glicerol	+	Insulina	+

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

I.4.10.- *Candida lusitaniae* van Uden y do Carmo-Sousa, 1959.

C. lusitaniae se ha relacionado con casos de candidiasis diseminada, incluyendo septicemia y pielonefritis. Se ha encontrado colonizando los tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario humanos. *C. lusitaniae* fue el primer aislamiento del tracto alimentario de los animales de sangre caliente y en el medio ambiente se han encontrado en la harina de trigo, cáscara de cítricos, jugos de frutas y leche de vacas con mastitis. Resultó difícil de distinguir de *C. tropicalis* con algunos sistemas de identificación de levaduras (Ellis, 1994).

Las colonias son de color blanco a crema, de superficie lisa y las células subglobosas, ovoides o elípticas (1,5-6 x 2,5-10 μ m). En agar-patata (AP) se forma pseudomicelio con cadenas de blastoconidios verticilados. Las parejas apareadas producen ascas y ascosporas en forma de mazas.

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Negativo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	v	v	+(D)	-	-	+(D)	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	v	Melecitosa	v	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	v
Celobiosa	+	D-ribosa	+(D)	D-arabinosa	v
Trehalosa	+	L-ramnosa	+	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	+

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

I.4.11.- *Candida norvegensis* (Dietrichson) van Uden y Farinha. ex van Uden y Buckley, 1970.

Sinonimia: *Torulopsis norvegica*.

La importancia clínica de *C. norvegensis* es muy reducida y únicamente ha sido encontrada como agente etiológico de peritonitis y candidiasis diseminada en un paciente en CAPD (Ellis, 1994).

Las colonias son de color blanco a crema, de superficie lisa y las células ovoides (2-3,5 x 3,5-5 µm) que no producen pseudohifas.

Preparación de tinta de India, negativa, no presenta cápsulas.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Negativo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+(D)	-	-	-	-	-	-	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	-	Melecitosa	-	Ribitol	-
Sacarosa	-	Almidón	+	D-manitol	-
Maltosa	-	D-xilosa	-	L-arabinosa	-
Celobiosa	+	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	-	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	-	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	-	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

I.4.12.- *Candida viswanathii* Sandhu y Randhawa, 1959.

C. viswanathii se ha aislado solamente a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de esputos (Sandhu y cols., 1976).

Las colonias son de color blanco a crema, brillante, de superficie lisa y las células globosas, ovoides o cilíndricas (2,5-7 x 4-12 μ m). El micelio es largo, ondulante, con ramas irregulares, blastoconidios globosos a ovoides, en cadenas, acomodadas en forma verticilada.

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Negativo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Positivo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	+	+	v	-	-	+(D)	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	+	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	+	L-arabinosa	+(D)
Celobiosa	+	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	+	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	+	Insulina	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable; D, demorada

I.4.13.- *Candida dubliniensis* Coleman y Sullivan, 1995.

C. dubliniensis se ha aislado principalmente en cavidades orales de los individuos infectados por VIH con candidiasis oral y en la vagina de una pequeña proporción de mujeres (Coleman y cols., 1997; Odds y cols., 1998; Sullivan y Coleman, 1998; Polacheck y cols., 2000).

Las colonias son de color blanco a crema, redondas. Las blastosporas son ovoides o esféricas (3-7 x 3-14 μm). *C. dubliniensis* produce pseudohifas (y algunas hifas verdaderas) con cortas ramas unilaterales, bilaterales o multilaterales en el septo y abundantes clamidosporas.

Preparación de tinta de India, negativo, no presenta cápsulas.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Pruebas fisiológicas:

Tubo germinativo.....Positivo

Hidrólisis de la urea.....Negativo

Crecimiento en cicloheximida (actidiona).....Positivo

Crecimiento a 37 °C.....Positivo

Reacciones de fermentación:

Glu	Gal	Mal	Sac	Lac	Raf	Tre	Mel
+	v	+	-(+)	-	-	v	-

Pruebas de asimilación:

Glucosa	+	Rafinosa	-	Eritritol	-
Galactosa	+	Melecitosa	-	Ribitol	+
Sacarosa	+	Almidón	+	D-manitol	+
Maltosa	+	D-xilosa	-	L-arabinosa	-
Celobiosa	-	D-ribosa	-	D-arabinosa	-
Trehalosa	v	L-ramnosa	-	Inositol	-
Lactosa	-	Etanol	+	Nitrato de potasio	-
Melibiosa	-	Glicerol	-	α -Metil-glucósido	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; v, reacción variable

I.5.- ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ESPECIES.

I.5.1.- RESERVORIO Y FUENTE DE INFECCIÓN.

La asociación de las distintas especies del género *Candida* con el hombre responde, en principio, a una situación de comensalismo. Es decir, de relación huésped-parásito, que resulta indiferente para el primero. *C. albicans* tiene una amplia distribución mundial y es la más frecuentemente aislada en individuos normales como un comensal de la cavidad oral (Cannon y Chaffin, 1999) y del tracto digestivo, pero menos abundante en el tracto vaginal de mujeres normales. Otras especies del género *Candida* son habitualmente saprobias de la mucosa digestiva (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) y respiratoria (*C. kefyr*, *C. tropicalis*), pudiéndose aislar de muestras ambientales. En la tabla VIII se han incluido las distintas localizaciones y frecuencias.

Debe precisarse que el hallazgo de levaduras del género *Candida*, cualquiera que sea la especie, en muestras clínicas de procedencia humana, no permite afirmar a priori una relación patogénica, salvo en aislamientos muy concretos, con muestras clínicas desprovistas, en sujetos normales, de cualquier presencia microbiana o parasitaria como pueden ser sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras.

Por otro lado, en la mayor parte de las ocasiones si es posible establecer una relación causal con un proceso patológico, debiéndose considerar la infección de tipo endógena, ocasionada a partir de levaduras del género *Candida* comensales previamente en el individuo. En algunas ocasiones, las especies de *Candida* que pueden relacionarse con la clínica humana, siendo *C. albicans* sin duda alguna la especie de mayor incidencia (Perfect y Schell, 1996; Aly y Berger, 1996; Mathaba y cols., 2000), han de ser definidas dentro del concepto general de las relaciones huésped – parásito como oportunistas. Las distintas especies, en general, del género *Candida* no limitan su presencia al género humano, ya que es posible realizar aislamientos de especies en hábitats diversos (animales, vegetales, agua, suelo, alimentos, etc.).

Tabla VIII. Localización de la flora habitual humana (Odds, 1988)

LOCALIZACION	<i>Candida</i> spp.
Piel	+
Oído externo	-
Conjuntiva	-
Mucosa nasal	+
Faringe	+
Boca	+
Intestino delgado	+
Intestino grueso	+
Mucosa vaginal	++

+, frecuente; -, nada frecuente; ++, muy frecuente

Sin embargo, *C. albicans* y *C. glabrata*, se consideran prácticamente como parásitos obligados de animales, interpretándose su hallazgo fuera de este hábitat como transitorio (Odds, 1988). En la tabla IX se relacionan los animales y otros hábitats en los que se han aislado especies del género *Candida*.

El hombre puede resultar infectado con levaduras del género *Candida*, siendo la fuente de infección los propios humanos y también los animales u otras fuentes antes mencionadas. Pero, en definitiva, cualquiera que sea la fuente de infección, la relación huésped – parásito se establece prácticamente en el ámbito de comensalismo. Es a partir de esta situación de comensalismo (cuando se producen determinadas circunstancias en el huésped) como surge el proceso lesional, que por ello lo hemos definido como de procedencia endógena en la mayoría de las ocasiones. La colonización a distintos niveles en el hombre por el género *Candida*, se mantiene habitualmente como tal sobre la base de los distintos mecanismos de defensa que el organismo se enfrenta a cualquier agente causal. La intervención de las barreras naturales inespecíficas, como son las barreras externas (piel y mucosas), es de gran importancia. Cuando estas barreras son superadas, y se alcanza el torrente circulatorio, interviene otro mecanismo inespecífico que es la fagocitosis. Por medio de ella se realiza la captación y destrucción de levaduras y pseudomicelios por los neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La actuación de los neutrófilos se produce por medio de dos mecanismos, uno de los cuales se realizaría a través de mieloperoxidasas (Odds, 1988).

En un segundo mecanismo estaría involucrada la síntesis de proteínas catiónicas, similares a la quimiotripsina, que actuarían aumentando la permeabilidad de la membrana de las levaduras para favorecer la pérdida de componentes intracelulares y lisis celular (Odds, 1988).

Tabla IX. Incidencia de especies de *Candida* en animales y en fómites, comida y otros hábitats. (CA= *Candida albicans*; CGU= *Candida guilliermondii*; CK= *Candida krusei*; CP= *Candida parapsilosis*; CKE= *Candida kefyr*; CT= *Candida tropicalis*; CG= *Candida glabrata*). Modificada por Odds (1988).

Aislamiento	CA	CGU	CK	CP	CT	CG
Primates	+	+	+	+	+	+
Mamíferos domésticos	+	+	+	+	+	+
Otros mamíferos	+	+	+	+	+	+
Aves	+	+	+	+	+	+
Fauna marina		+				
Agua de mar		+				
Suelo	+				+	+
Hierba	+					
Hojas	+					
Flores	+					
Frutas		+				
Cereales			+	+		
Vegetales		+				
Vegetales en descomposición			+			+
Productos lácteos	+	+	+	+	+	
Levadura pan						+
Bebidas dulces			+			+
Salazones			+	+		
Mermeladas			+		+	
Insectos		+		+		
Atmósfera	+		+			

+, presencia

I.5.2.- FACTORES QUE PREDISPONEN A LA CANDIDIASIS.

En circunstancias normales se mantiene un equilibrio entre el huésped y la microflora levaduriforme, que asegura el estado comensal de ésta. Diversas causas pueden alterar dicho equilibrio, permitiendo así una invasión virulenta de los tejidos del huésped por esa flora endógena. Gentles y La Touche (1969) describieron una relación de factores endógenos y exógenos que favorecen la candidiasis en humanos, siendo la de García-Rodríguez (1987) la que señala los factores que favorecen la candidiasis humana de forma más completa e incluida en este trabajo (Tabla X).

La severidad y la extensión de las infecciones por *Candida* tienden a incrementarse con el número y relevancia de los factores predisponentes que operan en cada caso. Por otra parte, algunos factores individuales que alteran las defensas antimicrobianas están asociadas con formas clínicas particulares de candidiasis. Así, un paciente predispuesto a una infección por *Candida*, puede recibir un tratamiento que más adelante aumente las posibilidades de desarrollar una candidiasis (Odds, 1988). De hecho, los casos publicados de candidiasis profundas se producen en pacientes previamente hospitalizados por otras enfermedades graves y, por otra parte, revisiones retrospectivas de historias y material *post mortem* revelan infecciones profundas por *Candida* en un porcentaje entre 1,2 y 1,8 (Bernhardt y cols., 1972; Kanda y cols., 1974 y Parker y cols., 1976).

Tabla X. Factores predisponentes de la candidiasis (García Rodríguez, 1987).

Factores Intrínsecos

Fisiológicos

Edad
Recién nacidos
Ancianos
Embarazo

Patológicos

Carcinoma
Leucemia
Linfoma
Enfermedad de Hodgkin
Anemia perniciosa
Anemia aplásica
Agranulocitosis
Granulomatosis séptica familiar
Alteración de la inmunidad celular
Diabetes
Hipotiroidismo
Hipoparatiroidismo
Malabsorción
Malnutrición
Enfermedades consuntivas

Factores Extrínsecos

Medicamentos

Inmunosupresores
Corticosteroides
Antimitóticos
Anticonceptivos
Antibioterapia antibacteriana
Antibioterapia antiparasitaria (metronidazol)

Médico-quirúrgicos o quirúrgicos

Cateterismo venoso o arterial
Cirugía cardíaca
Cirugía abdominal
Trasplante de órganos
Extracciones dentarias

I.5.2.1.- Enfermedades y trastornos predisponentes

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica causada por una acción inadecuada de la insulina (Salomon). Esta enfermedad, de origen genético, presenta un fenómeno muy heterógeno. Por esa razón, un examen de los tejidos de la cavidad oral en pacientes diabéticos presenta un problema muy complejo desde el punto de vista científico (Dedic y Masic, 1999). Verdaderamente, en la actualidad en la investigación hay conocimiento polémico sobre la relación entre diabetes mellitus y las enfermedades de la cavidad oral: estomatopatía diabética, candidiasis oral, alteraciones de la mucosa oral y periodontia.

La existencia de diabetes mellitus es un factor que predispone a un amplio espectro de infecciones entre las que está la candidiasis. Se han descrito infecciones genitales por *Candida* tanto en hombres y mujeres con distintas incidencias (Nagesha y Ananthakrishna, 1970; Skoglund, 1971; Sonck y Somersalo, 1963; Bánóczy y cols., 1987). Así la infección candidiásica mucocutánea sufre un aumento significativo en aquellos pacientes que presentan diabetes mellitus (Henseler, 1995; Abu-Elteen, 1999). También se considera implicada entre un 5-15% de los casos estudiados de candidiasis sistémicas. Esta patología ha sido asociada a las lesiones de lengua en las que era posible el aislamiento e identificación de *Candida* (Farman, 1977; Farman y Nutt, 1976; Rossie y Guggenheimer, 1997; Voros-Balog y cols., 1999), así Lynch y cols., 1969, encontraron una proporción mucho más alta de diabéticos entre los soldados infectados con candidiasis inguinal que entre los no infectados. También se han referido algunos casos balanopostitis candidiásicas severas entre diabéticos no diagnosticados.

La diabetes ha estado implicada en otras formas de candidiasis superficiales y profundas, de forma que diversos autores han encontrado un incremento, superior al normal, de la colonización por levaduras en muestras procedentes de vagina, recto, orina y orofaringe de pacientes diabéticos. También se ha producido en los últimos

años un fuerte incremento en el aislamiento de levaduras orales en individuos con diabetes mellitus (Aly y cols., 1995; Willis y cols., 2000), aunque el desarrollo de la candidiasis oral en estos pacientes tratados con insulina no es el resultado de una sola entidad, sino una combinación de factores de riesgo (Willis y cols., 1999); asociándose significativamente con fumadores de cigarro, usuarios de dentaduras y con un control pobre glucémico (Guggenheimer y cols., 2000; Willis y cols., 2000).

Tapper-Jones y col, 1981, mostraron que el fumar y poseer la dentadura postiza son dos factores que predisponen al aumento de las concentraciones de las levaduras orales entre los diabéticos; no sucediendo ello entre los diabéticos dentados no fumadores, que albergan concentraciones normales de levaduras, datos que son apoyados por los trabajos posteriores de Abu-Elteen y Abu-Alteen, 1998. Odds y col, 1987, encontraron una asociación entre las levaduras orales, la presencia de anticuerpos de suero de *Candida* y los niveles de glucosa en sangre y orina de los pacientes diabéticos. Además en este tipo de pacientes se ha demostrado que los factores generales como las endocrinopatías se caracterizan por favorecer las onicomycosis por *Candida*. La frecuencia de aparición de esta patología es superior en las mujeres (André y Achten, 1987; Arenas, 1990), con un predominio de la afección en las uñas de las manos, sobretodo, de amas de casa, empleados y estudiantes.

Los niveles elevados de glucosa en sangre y tejidos (Knight y Fletcher, 1971; Odds y cols., 1987; Ozturkcan y cols., 1993) o los niveles bajos de ácido láctico en piel (Kandhari y cols., 1969) parecen favorecer el desarrollo de *Candida* en estos enfermos. Kumar y sus colegas (1980, 1982). También se han sugerido que el suero y la orina pueden inhibir el crecimiento de la formación del tubo germinativo de *C. albicans*, si bien este hecho induce a equívoco. Las mujeres diabéticas presentan niveles vaginales altos de glucógeno, de modo que el efecto de la diabetes, en tales casos, se asemeja al del embarazo. Parece no haber diferencia en la inmunidad, mediada por células o fagocitosis, de *C. albicans* en leucocitos normales y diabéticos.

Otros trastornos endocrinos

Las formas de candidiasis más comúnmente asociadas con trastornos endocrinos, como son hipotiroidismo, hipoparatiroidismo e hipoadrenocorticismo, pueden englobarse con la denominación candidiasis mucocutáneas crónicas. Se han asociado casos de candidiasis diseminada con la enfermedad de Addison (hipoadrenocorticismo) (Alteras y cols., 1969; Podolsky y Ferguson, 1970) y el síndrome de Cushing (Giombetti y cols., 1971), aunque estos ejemplos son más bien excepciones que reglas.

Tumores malignos.

Los pacientes afectados de cáncer pertenecen, en general, a una población de riesgo frente a las infecciones sistémicas por *Candida*, como lo demuestran estudios realizados en las tres últimas décadas (Walsh y cols., 1992 y 1993; Goldstein, 1993; Batura-Gabryel y cols., 1994; Smolianskaia y cols., 1996; Zai y cols., 1997; Krcmery y cols., 1998; Niimi y cols., 1999; Redding y cols., 1999; Smolianskaia y cols., 1999; Mardani y cols., 2000). Sin embargo, existen diferencias entre las distintas formas de cáncer, especialmente leucemias y linfomas en la predisposición, frente a los tumores sólidos (Furuta y cols., 1994; Kralovicova y cols., 1997; Pagano y cols., 1999; Viscoli y cols., 1999).

Los tumores malignos son un factor predisponente no sólo a candidiasis sistémicas y esofagitis por *Candida*, sino también formas superficiales de infección, particularmente a candidiasis orales (Eyre y Nally, 1971; Rodu y cols., 1985; Yeo y cols., 1985; Challacombe, 1986; Fuks y cols., 1986; Odds, 1988; Gerson, 1990; Stinnett y cols., 1992). Los pacientes que sufren de cáncer terminal pueden experimentar síntomas orales, algunos de los cuales son propios de la infección y se producen como consecuencia de los cambios cualitativos y cuantitativos experimentados en la microflora oral (Sweeney y cols., 1998). Es más, la

colonización mucosal oral y la infección con *Candida* son comunes en pacientes que reciben radiación como terapia para el cáncer de cabeza y cuello (Redding y cols., 1999).

En las décadas anteriores a la de los años 70, las infecciones fúngicas eran diagnosticadas casi exclusivamente en pacientes considerados terminales. Con posterioridad, la frecuencia de las infecciones fúngicas en pacientes oncológicos ha aumentado considerablemente. Entre las causas más relevantes destaca la disminución del estado inmune, en concreto, la reducción que afecta a los mecanismos de inmunidad involucrados contra las infecciones fúngicas en pacientes con cáncer, debido a factores intrínsecos de la propia patología como también a la agresividad del tratamiento (Dronova y Smolianskaia, 1994). El desarrollo de la quimioterapia efectiva contra el cáncer cambió este escenario (Shechtman y cols., 1984; Samonis y cols., 1990). Además, el mejor control de las infecciones gram-negativas en pacientes neutropénicos ha fomentado el aumento de las infecciones. De este modo, las distintas especies de *Candida* pueden ser identificadas en la mayoría de las infecciones fúngicas sistémicas en los pacientes de cáncer (Nucci y cols., 1998) con distintas patologías, como la candidiasis oral (Boggs y cols., 1961) en un 15 % de pacientes. Se han descrito también complicaciones orales y gastrointestinales asociadas a procesos malignos (Winner y Hurley 1964).

La leucemia es uno de los procesos más frecuentemente asociado con la candidiasis y algunos autores consideran que los tratamientos inmunosupresores y antibióticos usados en esta patología, más que la enfermedad subyacente, pueden ser responsables de la aparición de candidiasis. Así, el uso de citotóxicos y agentes inmunosupresores, la cateterización intravenosa y nutrición parenteral, prolongada neutropenia, fiebre prolongada, entre otros, podrían haber contribuido al aumento de la frecuencia de candidiasis asociada con cáncer (Schumacher y cols., 1964; Bodey, 1966; Bodey y Luna, 1974; Young y cols., 1974; Reiss, 1986; Richet y cols., 1991; Bodey y cols., 1992; Martino y cols., 1993; Micozzi y cols., 1996; Ribeiro y cols., 1997; Kralovicova y cols., 1997; Nucci y cols., 1998; Gozdasoglu y cols., 1999, Krcmery y cols., 1999; De Marie, 2000). Con frecuencia, otras especies distintas de *C. albicans* (Bodey y Luna, 1974, Young y cols., 1974; Rajendran y cols., 1992)

aparecen como agentes etiológicos de candidiasis en pacientes leucémicos. En general, se observa una mayor prevalencia de infecciones causadas por especies de *Candida* no *albicans*. La fungemia propia de *C. albicans* o *C. glabrata* ocurre significativamente más a menudo en pacientes con tumores sólidos, mientras que la fungemia de *C. tropicalis* o *C. krusei* es más común en pacientes hematológicos (Meunier y cols., 1992).

Trastornos y enfermedades inmunopatológicas

Las infecciones por *Candida* en pacientes con SIDA pueden presentar formas poco comunes e impredecibles (Eversole y cols., 1986; Pierard, 1986; Radin y cols., 1983; Male, 1988; Rennie y Hellman, 1989; Perfect, 1990; Stevens, 1990) con fracasos terapéuticos (Babajews y cols., 1985; Fauci y cols., 1984, Tavitian y cols., 1986; Dismukes, 1991; Maeland, 1991; Tausch y cols., 1992; Arguero-Licea y cols., 1993; Perfect y Schell, 1996 y Janssen y cols., 1998). La producción de úlceras genitales u orales como consecuencia de infecciones por virus herpes o sífilis, predisponen a la infección por VIH (Hicks, 1991). Igualmente, pacientes VIH positivas presentan un mayor riesgo de padecer herpes genital primario y recurrente y verrugas genitales recurrentes y un riesgo moderadamente incrementado para gonorrea, tricomoniasis, candidiasis vaginal y úlceras genitales de etiología desconocida comparado (Fennema y colaboradores, 1995; Ulla y cols., 1993; Cohen y cols., 1995; Ramjee y cols., 1998). Muñoz-Pérez y colaboradores, en 1998, observaron, en relación con los factores de riesgo, que la sífilis y el herpes genital eran significativamente más común entre homosexuales que en heterosexuales y pacientes usuarios de drogas intravenosas, mientras que la sarna y la vaginitis candidiásica eran ligeramente más comunes en los usuarios de drogas intravenosas que en heterosexuales y homosexuales.

Otros factores, como uso de catéteres central venosos, administración de nutrición parenteral, terapia antifúngica previa, terapia previa con glucopéptidos, presencia de candidiasis oral/esofágica, infecciones concomitantes bacterianas y neutropenia, han sido considerados de riesgo entre la población infectada por el VIH

(Tumbarello y colaboradores, 1999) en relación a episodios de candidemia en estos pacientes (Astagneau y colaboradores, 1999).

La candidiasis oral, vaginal y esofágica aparece con gran frecuencia en pacientes con SIDA (Betta, 1985; Chandler, 1985; Fauci y cols., 1984; Jaffe y cols., 1983; Klein y cols., 1984; Stenderup y Schonheyder, 1984; López-Dupla y cols., 1992; Campos y cols., 1992; Fetter y cols., 1993; Elmets, 1994; Sangeorzan y cols., 1994; Aly y Berger, 1996; Launay y cols., 1998; Bhalodia y cols., 1998; Chocarro Martínez y cols., 2000). La candidiasis oral, en estos pacientes, es la forma más frecuente y se presenta en forma de infección oportunista en más del 70% de los varones homosexuales infectados por VIH (Silverman y cols., 1986; Barr y Torosian, 1986; Brawner y Hovan, 1992). Con una elevada frecuencia la infección es recurrente por la terapia antifúngica recibida (Coleman, 1998). Existen tres manifestaciones típicas de candidiasis oral: quelitis pseudomembranosa, eritematosa y angular (Clearinghouse, 1993). Las infecciones intertriginosas pueden estar localizadas en la ingle, axila o áreas mamarias. La marca del intertrigo es la presencia de pústulas que, eventualmente, se vuelven confluentes y están asociadas con maceración, eritema e intensos pruritos (Chapman, 1994). Aunque la candidiasis oral puede ocurrir en cualquier estado de la infección por VIH, es más común en pacientes con bajo recuento de células CD4 (menos de $300/\text{mm}^3$).

C. albicans es la especie predominante en los individuos VIH positivos, encontrándose mayoritariamente en la saliva, mucosa bucal y lengua (Torssander y cols., 1987; Tylenda y cols., 1989; Di Silverio y cols., 1991; Navazesh y cols., 1995; Martínez Machín y cols., 1997; Launay y cols., 1998; Teanpaisan y Nittayananta, 1998; Niimi y cols., 1999). Se observa, un aumento de la frecuencia de infecciones fúngicas oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, paralelo a una tasa elevada de especies no *C. albicans* (Masia Canuto y cols., 1999; Palacios y col, 1999), fundamentalmente asociada con el uso de imidazoles, adquisición nosocomial y tardío progreso del SIDA.

Los estudios realizados por Brawner y Hovan (1992) y Samaranayake (1992) sobre la candidiasis oral en SIDA apuntaban a una elevación de la incidencia, con

una especial presencia de serotipo B de *C. albicans*, desde 1982, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Pero la evolución de la presencia de las lesiones orales debidas a *Candida* ha descendido tras la aplicación de los tratamientos antiretrovirales altamente activos (Ceballos y cols., 1998).

La importancia de la esofagitis por *Candida* en este tipo de pacientes ha llegado a tener un valor predictivo de inmunodeficiencia celular subyacente (Jaffe y cols., 1983; Joshi y cols., 1984 y Patel y Thomas, 1986), pero el valor de la candidiasis oral como hecho diagnóstico del SIDA es controvertido (Chandrasekar y Molinari, 1985; Clotet y cols., 1986; Friedland y cols., 1986; Joy, 1984; Kein y cols., 1984; Tavitian y cols., 1986; Torssander y cols., 1985; Romanowski y Weber, 1984). Entre las mujeres infectadas lo más común es encontrar esofagitis por *Candida* y desde úlceras secundarias a herpes simplex, siendo muy raro el sarcoma de Kaposi. La prevalencia del virus del papiloma humano y neoplasia cervical ha aumentado en mujeres VIH seropositivas (Hankins y Handley, 1992; Williams, 1992; Cu-Uvin y cols., 1996). La candidiasis vaginal es probablemente muy frecuente en mujeres con SIDA (Rhoads y cols., 1987). Entre las mujeres VIH positivas los riesgos de colonización y de vulvovaginitis sintomática aumentan aproximadamente el triple y el cuádruplo respectivamente, en mujeres con cuantías CD4 por debajo de 200 células/mm³ comparado con cualquiera de las mujeres VIH positivas inmunocompetentes o mujeres VIH negativas (Duerr y cols., 1997).

Los trabajos de Pepin y colaboradores (1991) con prostitutas de Gambia muestran al comparar individuos seronegativos con aquellas mujeres infectadas con VIH-2 un sistema inmune anormal, con linfocitos CD4+ significativamente más bajos y linfocitos CD8+ más altos y una respuesta de proliferación más baja de linfocito después de la estimulación con fitohemaglutinina. Por otro lado, cuando las prostitutas VIH-2 seropositivas se comparan con las mujeres infectadas con VIH-1 se observa porcentajes significativamente más altos de CD4+ y en la proporción de CD4+:CD8+, mientras que los porcentajes de CD8+ son más bajos.

En cuanto a otras patologías, es también frecuente entre la población de pacientes VIH positivos presentar distrofias en las uñas producidas por *Candida*,

especialmente cuando el número de células T es menor a 100 células/mm³ (Kaplan y cols., 1987; Scher, 1991; Fisher y Warner, 1987; Prose, 1990; Daniel III y cols., 1992; Cribier y cols., 1998). Algunos trabajos que mencionan candidiasis gastrointestinales publicados antes del descubrimiento del VIH, son identificables como casos de SIDA sobre la base de otros hechos clínicos descritos (Gottlieb y cols., 1981 y Russi y cols., 1983).

Se han descrito infecciones por *Candida* asociadas con otros defectos inmunes: dos casos de granulomatosis moniliásica entre ciento veinticinco pacientes con hipogammaglobulinemia secundaria (Claman y cols., 1966), dos casos de meningitis por *C. albicans* en niños con inmunodeficiencias graves combinadas (Smego y cols., 1984), y un caso de gastroenteritis putativa por *Candida* en un paciente con deficiente secreción de IgA (Strober y col, 1976).

La candidiasis mucocutánea crónica es asociada frecuentemente con defectos en la función de los linfocitos T (Jing, 2000). Fleischmann y cols., (1986) aportaron un caso de meningitis fatal por *C. lusitaniae* en un niño con enfermedad granulomatosa crónica y sugirieron que este desarreglo podría haber predisuesto a otros catorce casos de meningitis primaria por *Candida* (Rutledge y col, 1986). La función anticandidiásica de los leucocitos está a menudo reducida en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (Fleischmann y cols., 1986; Kim y cols., 1969 y Lehrer y Cline, 1969); asimismo, y con una menor frecuencia, en pacientes con deficiencia de mieloperoxidasa (Lehrer y Cline, 1969) y talasemia (El-Falaky y Shoukry, 1977), aunque las infecciones por *Candida* en tales individuos son conocidas, aunque su incidencia es reducida (Moosman y Bojanovsky, 1975; Cech y cols., 1979; Larrocha y cols., 1982).

Otros trastornos congénitos o idiopáticos.

Los pacientes con fibrosis quística pueden sufrir de infección pulmonar por *Candida* (Jenner y cols., 1979), obteniéndose mayores recuentos de levaduras y una más elevada cantidad de anticuerpos en suero de *C. albicans*. Varias condiciones inusuales han sido asociadas con las infecciones candidiásicas en casos

extremadamente raros como son las lesiones cutáneas por *C. albicans* con micosis fungoides (Alteras y cols., 1982) y glucagonoma (Katz y cols., 1979); patologías orales por *Candida* con disqueratosis intraepitelial hereditaria benigna (Sadeghi y Witkop, 1979); síndrome de Sjogren (Tapper-Jones y cols., 1980).

El Síndrome de la hiperinmunoglobulina E es un desorden caracterizado por una tasa muy elevada de suero de IgE y de infecciones recurrentes. Los pacientes están, especialmente, predispuestos a tener abscesos estafilococales, implicando, normalmente a la piel, pulmones y articulaciones; pero ellos son también un riesgo para infecciones con otras bacterias y hongos. Yates y colaboradores, 1997, estudiaron un caso de endocarditis por *Candida* en un paciente con síndrome de hiperinmunoglobulina E. No había antecedentes previos de endocarditis por *Candida* en pacientes con síndrome de hiperinmunoglobulina E. La endocarditis fúngica es una complicación rara, que puede ocurrir en pacientes con síndrome de hiperinmunoglobulina E e intracatéter central.

I.5.2.2.- Disgresiones de estados fisiológicos normales.

Factores genéticos.

No existen evidencias de que ninguna sustancia indique variaciones genéticas en la susceptibilidad de las infecciones por *Candida* (Odds, 1988). Las distintas especies de *Candida* son colonizadores ubicuos del intestino humano y los problemas debido a la candidiasis pueden ser apreciados en toda extensión. De cualquier forma, es posible que un estudio epidemiológico de factores genéticos pueda revelar variaciones genéticamente basadas en la susceptibilidad individual de la invasión patológica de *Candida*.

Infancia.

La asociación de la candidiasis oral con datos pediátricos se remonta casi a tiempos de Galeno, y una completa y clara descripción de la enfermedad en niños la realizó Rosen von Rosenstein casi 70 años antes del primer aislamiento de *C.*

albicans (Rosen von Rosenstein, 1771). Winner y Hurley aportaron una particular consideración de la candidiasis neonatal y oral, aunque su suposición de “la principal importancia clínica de *C. albicans* es la de agente de enfermedad en la infancia y niñez” podría ahora ser superado por la alta prevalencia de la candidiasis genital entre adultos (Winner y Hurley, 1964).

Las formas sistémicas de candidiasis se elevan raramente en los muy jóvenes, excepto en los prematuros, que reciben un cuidado especial. La candidiasis diseminada, cuando aumenta en estos niños, frecuentemente implica el sistema nervioso central y las articulaciones. Factores como la intubación, cateterización intravascular y el tratamiento con múltiple antibióticos, combinados con los propios defectos al nacer y la inevitable inmadurez inmune de los prematuros crean un huésped comprometido para los patógenos como las especies de *Candida* (Elewski, 1996; Chiu y cols., 1997). Factores de riesgo como el cáncer, neurocirugía previa, trauma craneal y ser prematuros con bajo peso, son los causantes de la posibilidad de adquisición de meningitis fúngica nosocomial (Huttova y cols., 1998).

El aislamiento de levaduras en recién nacidos no es muy elevado, pero una amplia proporción de aislamientos suele estar asociada con lesiones por *Candida* (Taschdjian y Kozinn, 1957). La elevada susceptibilidad de los niños a la infección por *Candida*, se debe, casi con seguridad, a la inmadurez de sus defensas antimicrobianas. La mayoría de los autores están de acuerdo en que las infecciones durante los primeros días de vida proceden, primariamente, de contaminaciones maternas de los niños por levaduras que están en el canal del parto. El número de infecciones nosocomiales del sistema sanguíneo propias de *Candida* está en aumento en recién nacidos críticamente enfermos, siendo este patógeno transmitido verticalmente a partir de la madre o adquirido nosocomialmente del personal clínico (Waggoner-Fountain y cols., 1996; Raymond y Aujard, 2000).

En neonatos de madres infectadas por *Candida*, la enfermedad más común es la candidiasis oral. Factores que predisponen a las mujeres a candidiasis del pecho lactante son daño en el pezón en la fase temprana de lactancia, mastitis, uso reciente

de antibióticos en el postparto, largo uso antes del embarazo e historia de enfermedad vaginal (Amir, 1991; Heinig y cols., 1999).

La candidiasis oral o muguet (Gupta y cols., 1996), es la forma de infección más comúnmente encontrada, entre otras formas cutáneas (Herrod, 1990; Darmstadt y cols., 2000), gastrointestinales y pulmonares. Aunque raras, las candidiasis diseminadas pueden conducir a la muerte del niño. La malnutrición, cirugía previa y el número de días entre el primer hemocultivo positivo de *Candida* y el propio tratamiento antifúngico, son factores asociados con el subsecuente riesgo de morir por la propia infección de candidiasis sistémica: (Pacheco-Ríos y cols., 1997; Friedland, 1992), siendo crítico el período de tiempo transcurrido hasta la instauración de un tratamiento efectivo.

Las complicaciones orales durante la terapia en niños con cáncer representan un principio común de malestar y un origen potencial de infección sistémica. Datos de Childers y colaboradores, 1993, muestran que las complicaciones orales son una causa frecuente de mortalidad en niños con problemas oncológicos y son más frecuentes según el tipo de cáncer. Así, pacientes pediátricos con sarcomas presentan más úlceras e infecciones candidiásicas que los de leucemia. Las infecciones de *Candida* en niños con tumores sólidos ocurren cuatro veces más a menudo que en aquellos que tienen leucemia. Por otro lado, los estudios de Gozdasoglu y colaboradores, en 1999, demuestran que las infecciones fúngicas representan un problema creciente en niños con malignencias hematológicas. Sus hallazgos sugieren que hay un alto rango de colonización fúngica en aquellos niños que reciben quimioterapia por padecer leucemia aguda y linfoma.

Por otro lado, datos recientes indican que durante la última década, el rango de infección fúngica en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal ha incrementado de 0,96% a 5,9%. El sistema sanguíneo suele ser el lugar de infección más común (Rangel-Frausto y cols., 1999; Kossoff y cols., 1998; Fowler y cols., 1998; Saiman y cols., 2000), seguido por el tracto urinario (Phillips y Karlowicz, 1997; Mangiarotti y cols., 2000) y la piel (Campbell y cols., 2000). Importantes enfermedades subyacentes incluyen anomalías malignas, prematuras y congénitas.

Normalmente, el riesgo de fungemia puede ser atribuido a un gran número de antibióticos, a un prolongado período de administración de nutrición parenteral, intubación endotraqueal, cateterización venosa central y a la cirugía (Sherertz y cols., 1992; Herruzo Cabrera y cols., 1993; Padovani y cols., 1997; Huang y cols., 1999; Melamed y cols., 2000). La colonización de la mucosa oral parece ser el antecedente decisivo para que se produzca la colonización endotraqueal en los niños. El pH gástrico y el riesgo de mortalidad pediátrico a la vez que el tiempo de intubación endotraqueal pueden predecir la colonización endotraqueal patógena dentro en cuatro días de intubación (Rubenstein y cols., 1992). Por otro lado, el bajo peso de los recién nacidos representa también un importante factor de riesgo para la adquisición de la fungemia (Harms y cols., 1992; Beck-Sague y cols., 1994; Rowen y cols., 1994; Khadilkar y cols., 1995; Chiu y cols., 1997; Huang y cols., 1998; Lee y cols., 1998; Pradeepkumar y cols., 1998; Narang y cols., 1998; Singh y cols., 1999; Rowen y cols., 1999; Campbell y cols., 2000; Karlowicz y cols., 2000; Schwarze y cols., 2000). El análisis de los hechos sugiere que el aumento de la infección podría deberse a transmisión horizontal por el personal sanitario (Finkelstein y cols., 1993; Huang y cols., 1998).

La proporción de mujeres infectadas por VIH en edad fértil ha ido cada vez más en aumento y como consecuencia de una transmisión vertical del virus de materno filial (Kesson y Sorrell, 1993; Waldman, 1996; Kline, 1996; Makarova y cols., 1997). La transmisión que puede ocurrir en el útero, al tiempo del parto en que se mezclan la sangre materna infectada por VIH y la sangre del neonato, al igual que la ingestión y aspiración de fluidos corporales maternos infectados por el niño y en la lactancia. Como consecuencia de ello en la infección pediátrica por VIH los niños sintomáticos tienen una incidencia más alta significativamente de candidiasis clínica y candidiasis persistente por resistencia a la medicación que los niños asintomáticos infectados. Hicks y cols., 1998, llegaron a la conclusión que las levaduras de la saliva podían reflejar aislamiento oral o colonización de la mucosa, influyendo en el desarrollo de la candidiasis clínica en estos niños inmunocomprometidos. Reik y colaboradores, 1995, confirmaron previas observaciones del incremento de las infecciones bacterianas gram negativas en niños infectados con VIH y el diagnóstico y tratamiento dificultan que puedan ser localizadas cuando se trata con estos agentes.

Se necesita un alto índice de sospecha, porque desde que estos patógenos puedan ser prontamente dominados e indicado el tratamiento se puede salvar la vida.

Vejez.

Si bien se ha descrito a la vejez como un factor predisponente (Gentles y La Touche, 1969; Zimmerman, 1955), no hay evidencias consistentes, con independencia de sus enfermedades y tratamientos aplicados. No obstante, se han citado algunas lesiones inflamatorias, principalmente de la boca, en personas de edad avanzada, asociadas fundamentalmente con la pérdida de piezas dentales y/o a la utilización de prótesis dental (Beighton y cols., 1990; Loesche y cols., 1999). Se ha demostrado una mayor prevalencia de levaduras orales en al tercera edad (Marples, 1960; Smits y cols., 1966), contrariamente a lo sucedido en vagina, donde es raro encontrar levaduras en mujeres postmenopáusicas (Anyon y cols., 1971; Hilton y Warnock, 1975). El elevado recuento de levadura oral y la frecuente prevalencia de candidiasis oral entre los pacientes mayores que viven en instituciones aparecen asociados con problemas de higiene bucal y descuido en el cuidado de la dentadura (Wilkieson y cols., 1991; Samaranayake y cols., 1995; Budtz-Jlrgensen y cols., 1996; Rossie y Guggenheimer, 1997). En el trabajo realizado por Moskona y Kaplan, en 1992, con pacientes de instituciones geriátricas se observa que la estomatitis dental y las inflamaciones del paladar se relacionan con la edad dental solamente y no así con la calidad. Todas las lesiones frecuentes relacionadas con la dentadura aumentan con la edad del paciente y la edad dental. La escasa higiene oral aumenta la frecuencia de los cultivos positivos para *Candida* en las dentaduras.

La asociación de levaduras en las lesiones ungueales de los pacientes seniles con desórdenes tróficos en las piernas ha sido descrita por De Gentile y col, 1995, encontraron seis aislamientos de *C. ciferrii* en la uña de los pies de pacientes de edad avanzada y cuatro de ellos fueron asociados con lesiones ulcerosas de las piernas.

La infección del tracto urinario es una de las causas más comunes de infección en las personas de edad avanzada. Se ha demostrado que personas con más de 75 años, con casos de catéteres, obligados a permanecer en cama, con confusión,

anorexia con tubo de alimentación nasogástrica, decaimiento respiratorio necesitando ventilación mecánica y otros, son las más propensas a adquirir la infección (Kauffman, 1992; Assantachai y cols., 1997; Barnett y Stephens, 1997; Krcmery y cols., 1999).

Las tasas de muerte por candidiasis profunda son más altas en pacientes de mucha edad, aunque ocurre lo mismo con las tasas de mortalidad en otras muchas enfermedades. La senilidad, por sí misma, no puede por tanto considerarse un factor significativo en la predisposición a la candidiasis.

Embarazo.

Es estimado que el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de candidiasis vaginal durante su vida (Patel y cols., 1992; Geiger y Foxman, 1996). Pero la prevalencia de la enfermedad es mucho más elevada en mujeres embarazadas (Gardner y Kaufman, 1969; Vidotto y cols., 1992; Klufio y cols., 1995). La asociación entre el embarazo y la infección por *Candida* se encuentra, casi exclusivamente, en forma de candidiasis vaginal; estableciéndose, normalmente, estas infecciones cervicovaginales en el tercer trimestre de embarazo (Simoes y cols., 1998; van Rensburg y Odendaal, 1992; Blankhart y cols., 1999). La utilización de anticonceptivos orales, antibióticos, corticoesteroides y diabetes mellitus están entre los principales factores de esta infección. Algunos autores han cuestionado el papel de los anticonceptivos orales como predisponente de las mujeres a sufrir la enfermedad (Odds, 1979; Ryley, 1986; Sharief, 1998).

La flora bacteriana autóctona vaginal y específicamente las distintas especies de *Lactobacillus* juegan un papel crítico en la prevención de las infecciones vaginales y la transmisión de patógenos responsables de las enfermedades de transmisión sexual (Eschenbach y cols., 1988; Galask, 1989; Klebanoff y cols., 1991). La producción de peróxido de hidrógeno y el mantenimiento de un pH normal por las especies de *Lactobacillus* dan lugar a que se reduzca el sobrecrecimiento de microorganismos asociados con vaginosis bacteriana (Sobel y Chaim, 1996; Puapermpoonsiri y cols., 1996).

Los niveles de glucógeno aumentan en la última fase del embarazo (Cruickshank y cols, 1934); sin embargo, sin parecer claro el papel de *Lactobacillus* en la glucogenólisis, aunque sí la formación, en última instancia, del ácido láctico en vagina, es básica en este proceso (Rogosa y Sharpe, 1960 y Stewart-Tull 1964; Hillier y cols., 1992).

El estado de portador de levaduras en vagina es, sin duda, mayor en mujeres embarazadas que en las no embarazadas (Tabla XI). Otros estudios demuestran que dicho estado es mayor en el tercer trimestre del embarazo, presentando un brusco descenso en el período inmediato post-parto (Tabla XII).

Según Sobel, 1985, los efectos de los corticosteroides locales, el pH vaginal, la concentración del glicógeno vaginal y el estado del receptor del epitelio vaginal son factores que pueden hacer más vulnerables a las mujeres embarazadas a infecciones vaginales. Las concentraciones de progesterona y estradiol en plasma son más altas en el embarazo que en la fase luteica de la menstruación, al igual que la concentración total de la IgG. Además, Chen y cols., 1998, encontró en dos mujeres jóvenes embarazadas que la inducción al aborto podría causar endoftalmitis endógena por *Candida*. El tratamiento sistémico de corticosteroides podría incrementar el riesgo de la endoftalmitis. Stanley y cols., (1972), comprobaron, en una serie de mujeres embarazadas, una alta correlación entre las precipitinas en suero frente a *Candida* y las lesiones candidiásicas.

La infección por VIH en mujeres es un problema que va en aumento. A lo largo de todo el mundo, al menos el 25% de todas las infecciones vaginales ocurren en adolescentes o mujeres adultas, la mayoría de las cuales están en edad reproductora. Según Kesson y Sorrell, 1993, no se ha demostrado que la infección por VIH afecte a la fertilidad o influya fuera del embarazo, al menos que, exista una evidencia de disfunción inmune significativa, con CD4 inferiores a 400/mm³. Recuentos, por tanto, bajos de CD4 predisponen a las mujeres a complicaciones infecciosas oportunistas de VIH.

Tabla XI. Frecuencia de levaduras en vagina de embarazadas y no embarazadas (Odds, 1988).

Año	País	Nº (emb)	% positivo	Nº (no emb)	% positiv	Ref
1962	EE.UU	211	69,2	100	43,0	A
1964	Canadá	336	19,0	203	14,3	B
1967	India	65	33,8	845	4,3	C
1968	Sudán	25	56,0	165	30,3	D
1969	EE.UU	185	10,3	988	8,6	E
1970	India	51	54,9	412	26	F
1971	India	50	36,0	50	20	G
1972	EE.UU	172	54,7	828	45,7	H
1976	EE.UU	25	28,0	75	25,3	I
1979	Alemania	200	37,5	335	21,8	J
1979	India	50	14,0	100	8	K
1979	Alemania	162	5,6	1000	10,3	L
1979	Reino Unido	119	24,4	100	26	M

A) Lang WR., Frizt MA., Menduke H. B) O'Brien JR. C) Das M, Sen R. D) Mahgoub ED. E) Davis BA. F) Nagesha SN, Ananthakrishna NC. G) Raut M. H) Mclennan MT. I) Tashjian JM. J) Blaschke-Hellmessen R. K) Saraswathamna D. L) Knippenberger H. M) Singha HS, Balsdon MJ.

Tabla XII. Frecuencia de levaduras en vagina durante estados de embarazo y postparto (Odds, 1988).

Año	País	1 ^{er} Trimestre		2 ^o Trimestre		3 ^{er} Trimestre		1-7 Días post.		Ref.
		Nº	% Posit	Nº	% Posit	Nº	% Posit	Nº	% Posit	
1963	EE.UU	15	20	114	24,6	168	32,7			a
1964	Dinamarca	60	30	60	26,7	60	45,5	60	11,7	b
1969	Dinamarca	74	29,7	74	27	74	44,6			c
1969	EE.UU							21	4,8	d
1971	EE.UU							147	9,5	e
1976	Francia					400	18,8			f
1977	Alemania	243	23,5	243	22,6	243	18,1			g
1977	Alemania					487	26,8			h
1979	Alemania					200	35,7			i
1981	Italia	66	0	66	11,7	66	18,9			j

a) Buck A.A. y Hasenclever H.F; b) Pedersen G.T.; c) Pedersen G.T.; d) Davis B.A.; e) Spellacy W.N. y col.; f) Borderon J.C. y col.; g) Frerich W y Gad A.; h) Schnell J.D.; i) Blaschke-Hellmessen R. y col.; j) Fraizzoli G. y col.

I.5.2.3.- Factores dietéticos

Según Gentles y Latouche (1969), una dieta rica en glúcidos constituye predisponer a la candidiasis, debido a que la presencia de niveles elevados de estas sustancias en intestino, favorece la multiplicación de levaduras con preferencia sobre las bacterias (Cormane y Goslings, 1963) y Samaranayake (1986) promoviendo así la colonización de *Candida* en algunas regiones del tracto digestivo. Sin embargo, no es muy probable que un hipercrecimiento de levaduras, patológicamente significativo, pueda atribuirse únicamente a este factor. Se ha comprobado también que las deficiencias vitamínicas pueden predisponer a la candidiasis. Montes y cols., (1973) detectaron hipovitaminosis A en siete de doce casos de candidiasis mucocutánea. Este resultado puede correlacionarse con otros trabajos experimentales (Cohen y Elin, 1974 y De Graciansky y cols., 1957), habiéndose comprobado también una alta susceptibilidad a la candidiasis en ratas deficientes en vitaminas B1 y B2 (De Graciansky y cols., 1957). La anemia por deficiencia de hierro, ha sido también considerada como otro factor importante en la etiología de la candidiasis mucocutánea crónica. Fletcher y cols., (1975) encontraron en sujetos deficientes en hierro, una mayor frecuencia de *C. albicans* y una disminución de la respuesta linfocitaria a los antígenos de *C. albicans* en comparación con los lotes control (Joynson y cols., 1972).

I.5.2.4.- Factores mecánicos.

Traumas.

Se han descrito numerosos casos de peritonitis y septicemias por *Candida* en los que la infección se produjo como consecuencia de una lesión accidental. Es difícil valorar si la infección en estos pacientes fue originada por la lesión o por los procedimientos quirúrgicos y médicos implicados en su seguimiento. Estudios más recientes sugieren que los pacientes con quemaduras son especialmente susceptibles a la colonización e infecciones profundas por levaduras (Stanley y cols., 1994; Winkelman y Galloway, 1992; Allen y Ang, 1992; Chakrabarti y cols., 1992; Mousa, 1999). Algunos autores (Zanini y cols., 1983 y Zapata y cols., 1985; Ekenna y cols.,

1993) consideran que *Candida* es diseminada al torrente sanguíneo a partir de las quemaduras; sin embargo, Stone y cols., (1974), opinan que las heridas colonizadas en superficie no son fuente de infección muy significativa. Los procesos de seguimiento de quemaduras graves (antibióticos, cateterización, etc.) pueden ser, más que la naturaleza del trauma, los factores que incrementan la susceptibilidad de estos pacientes a la candidiasis (Gauto y cols., 1977; Borzotta y Beardsley, 1999).

Otros tipos de lesiones comunes entre la población son las producidas por el uso intenso de las lentes de contacto, representando un factor de riesgo importante asociado a las infecciones fúngicas (Rosa y cols., 1994). Úlceras producidas por hongos filamentosos en la córnea son comunes en aquellos países propios de climas tropicales y con una población mayoritariamente agraria (Upadhyay y cols., 1991; Chander y Sharma, 1994).

Oclusiones locales y maceraciones.

La distribución natural de *Candida* en el cuerpo sugiere una predilección de las levaduras por hábitats húmedos. La presencia de *C. albicans* es escasa en la piel, pero la probabilidad de recuperarla a partir de áreas húmedas e intertriginales tales como axilas, ingles y membranas interdigitales de pies y mano, es superior a la de otras zonas (Bridger, 1979; Macura y cols., 1984; Crislip y Edwards, 1989; Korstanje y Staats, 1995). De este modo, cualquier situación que implique oclusión o maceración de piel o membranas, así como el aumento de la humedad local, podría predisponer a un hipercrecimiento de la levadura y a infección. Maibach y Kligman (1962) fueron capaces de producir lesiones en la piel con *C. albicans* en voluntarios sólo cuando el lugar inoculado estaba cubierto con una vestimenta cerrada y los efectos oclusivos de los pañales en pacientes pediátricos han sido citados como una causa de infección por *Candida* en la zona de piel afectada (Dixon y cols., 1969 y 1972; Brookes y cols., 1971; Leyden y Kligman, 1978). Yaffee, en 1973, puso su atención en la dermatitis por *Candida* en pacientes cuya piel está tapada en los casos de inmobilizados en cama durante largos períodos de tiempo y Hansson y cols., 1985, describieron candidiasis cutáneas en 6 de 97 mujeres con úlceras en la pierna por el uso de medias impregnadas de untura. La maceración local de la piel ocurre en

muchas situaciones habituales. Así amas de casa, barmans, cocinero/as, pescadores, enfermero/as y otras personas que frecuentemente tengan las manos inmersas en agua son, particularmente, propensos a candidiasis en uñas, pliegues de uñas y grietas en los dedos (Denollin y cols., 1976; Feilchenfield y cols., 1958; Frain-Bell, 1957; Harrell, 1964 y Guinner y cols., 1964). La hiperhidrosis, manos frías y factores químicos o mecánicos, como manicura y pedicura, muy usuales en nuestro medio, son también factores que dan lugar a la presencia de onicomycosis candidiásica, con una mayor prevalencia entre las mujeres (Arenas, 1990).

Hay dos formas de candidiasis oral que hacen pensar en los elevados factores locales de maceración/oclusión. La quelitis angular implica maceración de la piel en la comisura de los labios y podría producir una superinfección candidiásica y en estomatitis por uso de dentaduras, la inflamación del paladar aparece elevada a consecuencia del hipercrecimiento de la levadura en el espacio ocluido entre la dentadura y el paladar. Varios autores han detectado una prevalencia más alta de candidiasis oral entre los usuarios de dentaduras que entre los no usuarios (Berdicevsky y cols., 1980; Budtz-Jorgensen y cols., 1983; Marcano, 1981; Mitchell, 1982; Vandebussche y Swinne, 1984; Nanetti y cols., 1993; Barrett y cols., 1998), aunque es posible que el principal efecto de las dentaduras es incrementar las concentraciones de levaduras más que establecer poblaciones de las mismas en aquellas bocas que no las presentaban previamente, debido a la presencia de una interfase. Por lo regular, la estomatitis de adultos que no está relacionada con otras enfermedades es el resultado de dentaduras mal ajustadas o de mala higiene bucal (Rippon, 1988). *Candida* puede crecer por completo en las dentaduras, de modo que la inflamación de los tejidos se debe a los materiales tóxicos acumulados que existen debajo de la dentadura. Este trastorno se presenta en el 25 % de quienes usan dentaduras y hasta en el 60 % de los que sobrepasan los 65 años. Diferentes experimentos han demostrado la adherencia de *C. albicans* a la mucosa bucal y al acrílico de las dentaduras (Critchley y Douglas, 1985; Douglas, 1985; Radford y cols., 1999).

I.5.2.5.- Factores Iatrogénicos.

La incidencia de las candidiasis profundas parece haberse elevado con la introducción de nuevas técnicas en Medicina.

La endocarditis por *Candida* solía ser una enfermedad extremadamente rara, vista casi exclusivamente en drogadictos (Ben Joseph y cols., 1985), hasta que los procedimientos quirúrgicos a corazón abierto se han ido generalizado. Ahora suelen verse con más frecuencia como complicación de esta forma de cirugía (Herling y cols., 1984; Mencl y cols., 1985; Citak y cols., 1992; Tornos y cols., 1992; Johnston y cols., 1994; Verghese y cols., 1998; Picarelli y cols., 1997; Llinares-Mondejar y cols., 1997; Fearon y cols., 1997; Mathew y cols., 1999; Verghese y cols., 1999; Ramírez Moreno y cols., 2000; Veraldi y cols., 2000) que con los drogadictos. La introducción de métodos de alimentación intravenosa, con catéteres vasculares, ha conducido, asimismo, a un incremento de las septicemias por *Candida* y candidiasis diseminadas. Es más, aquellos pacientes con válvulas protésicas del corazón que desarrollan candidiasis nosocomial representan un notable riesgo de tener o desarrollar candidiasis meses o años más tarde (Nasser y cols., 1997).

La colonización por levaduras aumenta en proporción al tiempo de estancia del paciente en el hospital (Marks y cols., 1975; Odds y cols., 1980; Mitchell y cols., 1982; Vidotto y cols., 1986; Rubinstein y Lang, 1995; Gouello y cols., 2000), en especial en aquellos que han sido intervenidos quirúrgicamente o sometidos a tratamientos con antibióticos o corticosteroides, o los que requieren cuidado intensivo, factores que ya han sido revisados. Aunque este fenómeno puede estar relacionado con el grado de salud-enfermedad y debilitamiento del paciente, es bien cierto que las levaduras patógenas se encuentran, inusitadamente, con más frecuencia en ambientes hospitalarios.

Antibióticos

En teoría, la mayoría de los antibióticos poseen la habilidad de eliminar las bacterias de los hábitats microbianos humanos que, normalmente, compiten con las levaduras por los nutrientes. Tales alteraciones en la microflora pueden conducir al hipercrecimiento y consecuente infección de levaduras, puesto que ellas no son afectadas en sí mismas por los antibióticos antibacterianos. En la práctica sólo el tratamiento de amplio espectro o combinado de antibióticos de espectro reducido, parecen producir este efecto de modo bastante significativo. La relación entre la terapia antibiótica y la candidiasis se ha discutido en varias revisiones: Giunchi, (1985); Winner y Hurley, (1964); Seelig, (1966 y 1968); Rossie y Guggenheimer, 1997; Rodríguez-Tudela y Cuenca-Estrella, 1999; Kremery y cols., 1999, todas ellas apoyadas en un gran número de casos, concluyendo que la colonización se incrementa en sujetos tratados con antibióticos de amplio espectro. La eliminación de la competición bacteriana es realmente el mecanismo importante por el que los antibióticos afectan al número de levaduras *in vivo*. No se dispone de una amplia base científica que demuestren que el efecto estimulante de los antibióticos antibacterianos sobre el crecimiento de *C. albicans* (Winner y Hurley, 1964). Si se sabe que pueden acrecentar el crecimiento en los fluidos naturales, tales como aspirados vaginales (Bisschop y cols., 1985) y saliva (Knight y Fletcher, 1971), donde sus efectos podrían ser suprimir la bacteria autóctona. Ciertamente los antibióticos podrían tener propiedades inmunosupresoras que hicieran reducir la resistencia del hospedador a *Candida*.

Los trabajos basados en grupos individuales en orofaringe (Jose, 1975; Mohamed, 1975; Smits y cols., 1966 y Tewari y Fletcher, 1966), esputos (Chakravarty, 1964 y Chakravarty y Sandhu, 1964), heces y recto (Fitzpatrick y Topley, 1966; Holt y Newman, 1967; Middleton, 1967; Smits y cols., 1966 y Tewari y Fletcher, 1986), orina (Haley, 1965) y en vagina (Caruso, 1964), tratados con antibióticos, demuestran un aumento en términos de frecuencia y, ocasionalmente, en términos de número de la población de levaduras. El aumento de la incidencia de la candidiasis vaginal se encuentra directamente relacionado con el incremento de la

duración del uso de los antibióticos (Ryley, 1986; Krcmery y cols., 1998; Spinillo y cols., 1999).

Se ha observado que la eritromicina y cotrimozazol (Bridges y cols., 1980) y varios aminoglicósidos (Ferrari y cols., 1980) provocan una reducción de la actividad neutrófila anticandidiácida *in vitro*. Sin embargo, otros antibióticos, como la tetraciclina, cloranfenicol, penicilina, gentamicina, azlocilina y carbonilina no muestran este efecto (Bridger, 1979; Bridges y cols., 1980). Otras sustancias como la cimetidina, famotidina y omeprazol empleados en la terapia para reducir la acidez de pacientes con úlcera duodenal están asociados con el incremento significativo del crecimiento fúngico, por el alto pH gástrico. Goenka y colaboradores, en 1996, encontraron que el tratamiento para pH gástrico superior o igual a 4 estaba asociado con una proporción fúngica más alta que para los valores de pH menores a 4.

De sus experimentos con animales, Blyth (1958) llegó a la conclusión de que los antibióticos disminuyen, en cierto grado, la inmunidad natural del huésped a la infección. Sin embargo, el mecanismo antibiótico-predisposición a la candidiasis no ha sido considerado ampliamente porque, como Winner y Hurley (1964) han indicado, los pacientes tratados con antibióticos múltiples o con los de amplio espectro son, por lo general, enfermos graves y, por lo tanto, tienen ya deprimidas las defensas microbianas. Consideraciones similares deben tenerse en cuenta en relación con los informes clínicos de candidiasis asociadas con terapia antibiótica. El papel de dicha terapia, como factor predisponente a la candidiasis en tales pacientes, es por lo tanto imposible de establecer con confianza.

Metronidazol

Moffett y MacGill (1960) fueron los primeros en sugerir que el tratamiento tópico de la tricomoniasis vaginal con metronidazol (Flagil) puede predisponer a los pacientes a candidiasis vaginal. Hay estudios posteriores (Alteras y cols., 1965; Beveridge, 1962; De Rom y cols., 1961; Keighley, 1962; Oller, 1969 y Peters y cols., 1972) que apoyan este punto de vista, pero sin aportar la evidencia concluyente

hacia dicha predisposición por este fármaco, no obstante, concuerdan lo suficiente para sugerir al menos su posibilidad.

Corticosteroides

Los corticosteroides son componentes con un pronunciado efecto antiinflamatorio e inmunosupresor (Mims, 1987). Por lo tanto, ofrecen un considerable potencial reductor al hospedador a la invasión por *Candida*, y resulta un poco asombroso que la administración de corticosteroides a los pacientes se cite frecuentemente como un factor predisponente en muchos casos de candidiasis sistémica y superficial. También la terapia con esteroides ha sido citada como el factor principal predisponente, en varios casos de candidiasis oral (Folb y Trounce, 1970; Lehner y Ward, 1970; Zegarelli y Kutscher, 1964), cutánea (Bradford y Montes, 1972; Lynch y cols., 1969) y ocular (Robertson y cols., 1974). Varios estudios sugieren que la terapia con esteroide supone el principal factor que predispone a la candidiasis superficial (Schechtman y cols., 1986) o sistémica (Date y cols., 1983; Auger y cols., 1989; Perfect, 1990; Ringel, 1990). Tal como ocurre con los antibióticos, es posible que la importancia de los esteroides como factores predisponentes a candidiasis hayan sido, a veces, exagerada.

Un gran número de investigadores han demostrado, en experimentación animal, que los esteroides aumentan la severidad de un amplio espectro de infecciones por diversas especies de *Candida*. Los intentos de demostrar el efecto directo de los esteroides en el crecimiento *in vitro* de *Candida*, han sido improductivos. Se ha comprobado que el estriol estrona, benzoato de estradiol, etinilestradiol y testosterona no tienen efecto alguno en el crecimiento de *C. albicans* (Kaben y Neumann, 1970; Moursi y Refai, 1968; Neumann y Kaben, 1971). Marsh y colaboradores (1983), en una completa evaluación estadística de factores fundamentales en 55 casos de candidiasis sistémica, encontraron que sólo una combinación de terapia de esteroide, terapia de antibiótico y una total nutrición parenteral era un factor de riesgo estadísticamente significativo, uno de esos factores considerado individualmente o a pares era significativo.

Aerosoles de esteroides.

Dipropionato de beclometasona, valerato de betametasona, fosfato de dexametasona, cromoglicato de sodio y acetona de triamcinolon son todos los esteroides sintéticos que han revolucionado el cuidado del asma en niños y adultos. Son formulados como aerosoles que facilitan la inhalación de esteroides que el tratamiento sistémico con componentes de absorción oral. En 1964, Dennis e Itkin informaron que 5 de 25 pacientes tratados con inhaladores de fosfato de dexametasona (Decadron) desarrollaron candidiasis orofaríngeal y Zegarelli y Kutscher de cuatro casos similares en pacientes que usaban aerosoles de triamcinolon. La introducción del dipropionato de beclometasona (Intal) diez años más tarde indujo a un interés masivo a candidiasis oral, faríngeal y laríngeal como una complicación de este medicamento. Un estudio de 1974 sugiere que el 77% de los usuarios de beclometasona desarrollaron candidiasis oral, pero ningún otro autor ha logrado descubrir la condición de tal notable escala.

Algunos autores afirmaron tan sólo el incremento del aislamiento de *Candida* oral con los inhaladores de esteroides (Toogood y cols., 1984; Stead y Cooke, 1989), pero no todos pudieron detectar de forma ecuánime este efecto (Ben-Aryeh y cols., 1985). Algunos pensaban que la incidencia de infección oral por *Candida* o la colonización era una función de la dosis del inhalador de esteroide (Toogood y cols., 1984), mientras otros consideraban que el uso concomitante de esteroides sistémicos era el responsable (Morrow-Brown y cols., 1977). En 1979, Vogt puso atención en las notables variaciones de criterio usadas para el diagnóstico de la candidiasis oral, ordenados desde sólo cultivos positivos en algunos informes a sólo apariencia clínica en otros. Criticó los ensayos realizados con muy pocos pacientes o por un período corto de tiempo. Considerando tan sólo las pruebas hechas a más de 100 pacientes inhalando esteroides durante 6 meses o más tiempo demostró la incidencia de candidiasis oral asociada con terapia con beclometasona o triamcinolona de aproximadamente 4-13%. Concluyó que la utilidad de la terapia lejos del sobrepeso de los riesgos: “Puesto que las infecciones por *Candida* ocurren en sólo una pequeña parte de la población de los pacientes, raramente causa severos síntomas, normalmente son colonizaciones superficiales y pueden ser tratadas prósperamente

en la mayor parte de las instancias sin la interrupción del tratamiento del aerosol, la aparición ocasional de la enfermedad con terapia de esteroide inhalado parece poca causa para preocuparse”. Esta conclusión permanece aún válida.

Se ha descrito una asociación entre corticosteroides inhalados y candidiasis esofágica (Simon y cols., 1997). La deposición del medicamento en el esófago después de ser ingerido y la subsecuente colonización e infección con *Candida*, aparece a continuación. Factores mitigantes como el enjuague de la boca, aparatos espaciador e inmunidad mucosal podrían ser responsables de la interrupción de los casos.

Anticonceptivos hormonales.

La candidiasis vulvovaginal es un proceso inflamatorio frecuente en mujeres, pero no ha sido estudiado extensamente en mujeres que ejercen la prostitución. El papel de las prostitutas en las enfermedades de transmisión sexual ha sido valorado en diferentes estudios. Datos relacionados con la prevalencia de enfermedades de transmisión sexual en prostitutas varían alrededor del mundo, dependiendo de la veracidad de las técnicas de diagnóstico, la eficacia de los regímenes de tratamiento, la prevalencia local de las enfermedades de transmisión sexual y el uso de preservativos (Otero y cols., 1998). Por otro lado, datos de Ginter y colaboradores, 1992, no sugieren que la promiscuidad por sí sola sea un factor que predisponga a presentar candidiasis vaginal; aunque sí se observaron diferencias significativas en la edad de las mujeres del estudio, porque aquellas que estaban en la tercera década de vida están más inclinadas a infecciones vaginales por *Candida* que grupos de edad mayor.

Medidas preventivas a tener en cuenta por las mujeres para disminuir la incidencia de candidiasis vulvovaginal podrían ser un apropiado uso de anticonceptivos, así como de su vida sexual y hábitos de higiene personal (Spinillo y cols., 1993). Bourg, en 1964, fue el primero en sugerir que las mujeres que usan anticonceptivos hormonales anovulatorios podrían estar predispuestas a candidiasis vaginal. Observó que seis de sesenta pacientes a las que prescribió la píldora

desarrollaban la enfermedad vaginal. Más tarde aparecen otros trabajos sobre candidiasis vaginal asociada con el uso de anticonceptivos hormonales. Por ejemplo, Yaffee y Grots (1965) describieron cuatro casos de vaginitis por *Candida* que resultaron refractarios a la terapia antifúngica hasta que las pacientes dejaron de utilizar los anticonceptivos orales. Porter y Lyle (1966) estudiaron trece casos de candidiasis vaginal intratable que describen como “causados por la terapia anticonceptiva oral”. Surgió así la opinión, frecuentemente reiterada, que los anticonceptivos hormonales predisponen a infecciones vulvovaginales por *Candida*.

Desde 1964 han sido sustanciales los cambios en la composición farmacéutica de los anticonceptivos hormonales, particularmente una larga reducción en el contenido de estrógeno de los anticonceptivos de tipo combinado, pero estos cambios han sido poco reflejados en la literatura de candidiasis (Odds, 1988).

Si los estudios en los que los diferentes autores expresan meramente sus impresiones subjetivas clínicas del sujeto son desestimados, la mayor parte de la incidencia concerniente a los anticonceptivos hormonales como factores predisponentes vienen principalmente de exámenes del aislamiento vaginal de *Candida* en mujeres usuarias y no usuarias de estas drogas (Odds, 1988). La mayoría de los estudios transversales analizados no proporcionan una evidencia definitiva de los anticonceptivos hormonales sobre la prevalencia de *Candida* en vagina. El análisis realizado por Odds sobre veintitrés estudios transversales, posteriores a 1964, revela que sólo en cinco de ellos había una alta prevalencia de *Candida* en vagina entre las usuarias de anticonceptivos hormonales, que es estadísticamente significativa al nivel de $p < 0,01$ y otros dos son significativos al nivel de $p < 0,05$. Wied y col (1966) encuentran un incremento significativo de *Candida* en vagina entre las usuarias de estos anticonceptivos, si bien su estudio se basó en observaciones microscópicas sin realización de cultivos.

Los resultados varían al distinguir pacientes que utilizan anticonceptivos de tipo combinado (estrógenos y progesterona) o sólo con progesterona (Anyon y cols., 1971; Davis, 1969; Lapan, 1970; Leegaard, 1984; Spellacy y cols., 1971; Walsh y cols., 1968). La mitad de los informes confirmaron estadísticamente variaciones

significativas en la población vaginal de *Candida* y los datos sugieren que el componente estrogénico tiene un efecto mayor en dicha población que la progesterona. Esta conclusión es apoyada por el trabajo de Jackson y Spain (1968), en el cual se comprueba que más mujeres libres de *Candida* en vagina se hacen positivas, significativamente, tras varios meses de tratamiento con anovulatorios de tipo combinado que con los de tipo secuencial.

Una editorial de una revista médica de 1966 sugería que los anticonceptivos estrogénicos predisponían a candidiasis por inducir a un estado como de embarazo y recomendaba píldoras progestogénicas para disminuir el riesgo asociado de candidiasis vaginal (Editorial, 1966).

La información de estudios longitudinales de aislamiento de *Candida* con relación a la contracepción hormonal varía de un estudio a otro. Diddle y colaboradores (1969) encontraron una incidencia de señales clínicas significativamente más alta de candidiasis vaginal sólo en pacientes que han usado contraceptivos orales en un tiempo superior a 12 meses: de cualquier forma, no confirmaron su diagnóstico por cultivo de *Candida*, y las indicaciones clínicas son notoriamente una base no real para un diagnóstico de enfermedad. Topozada y colegas (1986) demostraron la elevada tasa de aislamiento vaginal de *Candida* de 2% a 44% de cincuenta mujeres después de usar durante 12 meses contraceptivos orales. Otros estudios longitudinales produjeron poca o nada evidencia por el aumento de levadura en la vagina o descarga vaginal entre pacientes tratadas con anticonceptivos hormonales durante más de 12 meses (Mourad y cols., 1974; Morris y Sugrue, 1975).

Sylvester (1986) encontró que la correlación entre los casos de candidiasis vaginal y pacientes usuarios de anticonceptivos hormonales se ha debilitado desde 1977 -una ligera caída en la incidencia de vaginitis candidiásica paralela a un incremento en el uso de contraceptivo hormonal. Esto podría reflejar el cambio en la naturaleza química de los anticonceptivos orales ya mencionados anteriormente. Por otro lado, la progesterona, inyectada como anticonceptivo de larga duración, no parece tener efecto en las tasas de colonización por *Candida* (Ponton y Jones, 1986).

Drogas que inducen neutropenia.

Pacientes con cáncer, particularmente los que presentan malignancias hematológicas, a menudo reciben quimioterapia con una variedad de drogas citotóxicas cuyo efecto es inducir neutropenia (Karabanis y cols., 1988; Meunier, 1988; Bodey, 1990; Anaissie, 1992; Samonis y Bafaloukos, 1992; Tack y Santman, 1992; Nolla, 1993; Jandrljic y cols., 1995; Wingard, 1995; Bohme y cols., 1999; Connolly y cols., 1999; Grudeva-Popova y Goranov, 1999; Pagano y cols., 1999; Richardson y Kokki, 1999; Buchheidt y cols., 2000). El estado neutropénico es aquél que ofrece predisposición sustancial a infecciones, incluyendo candidiasis sistemática, y neutropenia es un factor fundamental de una alta proporción de casos de candidiasis diseminada. Las drogas inductoras de neutropenia estimulan un aumento en la colonización por *Candida* del intestino (Tomoda y cols., 1984) y actinomicin D, 1,3-bis(2-cloroetil)-nitrosourea y otros (Wingard y cols., 1982) potencian las infecciones sistémicas de *Candida* en animales de experimentación.

Otros agentes inmunosupresores.

Otros agentes inmunosupresivos más que corticoesteroides y citotóxicos han sido examinados por su posible relación con la infección candidiásica. La morfina tiene efectos inmunosupresivos en ratones y potencia la infección por *Candida* (Tubaro y cols., 1983). La sobredosis de globulina intravenosa inmune ha bloqueado el sistema reticuloendotelial -un presunto caso de candidiasis humana (Cross y cols., 1984).

Cimetidina.

La cimetidina fue introducida como un antagonista del receptor de hidrógeno para el cuidado de úlceras gástricas y duodenales. En algún caso ha sido descrito como potenciador de la invasión de *Candida* en úlceras gástricas y previene su curación o incrementa la candidiasis gástrica lejos del lugar de la úlcera o incluso estimula a las levaduras perforar úlceras y causar peritonitis u otras infecciones sistémicas (Peterson y cols., 1978; Freund y cols., 1979; Neeman y Kadish, 1984;

Thomas y Reddy, 1983 y 1985; Roy y McCallum, 1984; Triger y cols., 1981; Yang y cols., 1999).

Se ha encontrado una asociación entre cimetidina, levaduras y úlceras en algunos (Boero y cols., 1983), pero no en todos, los casos (Di Febo y cols., 1985; Gotlieb-Jensen y Andersen, 1983; Minoli y cols., 1984). De cualquier forma, se recuerda que las levaduras se encuentran normalmente en el estómago y la biopsia del tejido de invasión prueba realmente que las levaduras asociadas con las úlceras están involucradas patológicamente. La presunción, frecuente entre los estudios citados, que el elevado pH gástrico asociado con la terapia con cimetidina favorece el crecimiento de levaduras es, probablemente, un rojo arenque.

Virtualmente ninguna lesión preexistente que pueda actuar como territorio fértil para el sobrecrecimiento de un parásito microbiano secundario y un sobrecrecimiento de *Candida* ha sido descrito, por ejemplo, en asociación con lesiones de herpes simplex en el intestino, varias superficies aireadas, enfermedades de piel y ulceraciones, una fístula oronasal, anomalías en la lengua, hipodontia, tuberculosis, caries dental y amígdalas inflamadas (Yacono, 1985; Thompson y cols., 1985; Kinirons, 1983; Kullaa-Mikkonen y Kotilainen, 1983). Más directamente es el hecho que el sobrecrecimiento secundario de *Candida* se ha notado frecuentemente en úlceras del tracto digestivo más bajo y en úlceras gástricas y duodenales en pacientes no tratados con cimetidina. Por lo tanto, parece posible que el interés en los efectos de cimetidina ha despertado de nuevo el conocimiento de un viejo problema más que predisponer fisiológicamente a candidiasis.

Drogas psicoactivas.

Varios tranquilizantes completan la lista de drogas que han sido asociadas específicamente con infecciones candidiásicas. La prevalencia oral de levaduras entre los pacientes de psiquiatría no es en ningún caso alta y las drogas psicoactivas podrían no ser necesariamente el único factor que contribuye a las infecciones. Clorpromazina y componentes relacionados inhiben el crecimiento de *Candida* y la respiración *in vitro* (Marmioli y cols., 1985), una observación que duramente

soporta la idea de los componentes de fenotiazina como factores que predispongan a la candidiasis.

Cirugía.

Innumerables estudios de casos individuales han descrito candidiasis profunda en pacientes después de la cirugía y algunas revisiones a gran escala cita a la cirugía como un factor principal de predisposición (Marsh y cols., 1983; Walsh y cols., 1985; Lelarge y Mariot, 1992; Martín, 1993). La incidencia de candidemia es dramáticamente más alta en Unidades de Cuidados Intensivos de alto riesgo como: Unidades de Cuidado Intensivo de Cirugía frente a las Unidades de trasplante de médula espinal y en Unidades de Oncología-Hematología, debido a la severidad propia de la enfermedad del paciente, tipo de Unidad de Cuidado Intensivo, tiempo de permanencia y otros (Trilla, 1994; An y cols., 1997). Según Giamarellou y Antoniadou (1996) la cirugía gastrointestinal y de quemaduras predisponen a candidemia nosocomial. El tracto gastrointestinal superior es un reservorio importante de aquellos organismos que causan infección adquirida en Unidades de Cuidados Intensivos (Marshall y cols., 1993). Se ha demostrado también, por Menezes y colaboradores (1994), que la notable mortalidad elevada de los pacientes con endoftalmitis candidiásica en las Unidades de Cuidados Intensivos es un fiel indicador de del riesgo de sufrir infección por *Candida* para este grupo de pacientes. La endoftalmitis producida por el género *Candida* es una infección secundaria seria producida por diseminación hematógena o por inoculación directa de estos organismos una vez sufrido un trauma o una cirugía de ojo (Hidalgo y cols., 2000).

Los factores de riesgo para el desarrollo de una infección por *Candida* en cirugía son numerosos y entre ellos podemos destacar: administración de antibióticos de amplio espectro, monitorización invasiva, larga hospitalización, cateterización central, nutrición parenteral, enfermedades que afectan la respuesta inmune y la propia cirugía (Miró y Bisbe, 1993; Rantala, 1993; Naef y cols., 1994; Freydière y Guinet, 1997).

Todos los pacientes con órgano trasplantado requieren de inmunosupresión, ya que se encuentran en predisposición de sufrir serias infecciones. La extrema vulnerabilidad de estos pacientes ha permitido la institución de varias medidas anti-infectivas.

El control de la infección en un trasplante de médula espinal es complejo (Sinnott y Rubin, 1991; Meyers, 1990). Son beneficiosos, además, la higiene del paciente, el uso de máscaras por el personal clínico, estricto control de lavados de manos por parte del personal (Strausbaugh y cols., 1994) y los visitantes y el aislamiento de receptores de trasplante. Descontaminación de suministros de agua y comidas y filtros de aire podría también disminuir la incidencia de serias infecciones bacterianas y fúngicas (Atkinson, 1994).

La candidiasis sistémica ha emergido con las mejoras técnicas de trasplantes de médula espinal (normalmente asociadas con malignencias hematológicas que ya predisponen a candidiasis) como un claro azar del procedimiento (Berkowitz y cols., 1983), con un caso de incidencia variando de 3,5% a 21,7% en diferentes series (Clift, 1984; Kay H y cols., 1983). La colonización de *Candida* puede ser suprimida con cuidado con la profilaxis antifúngica en los receptores de la médula espinal (Berkowitz y cols., 1985; Navari y cols., 1984), lo cual es importante porque las dos principales drogas para el tratamiento de la candidiasis sistémica son contraindicadas en el trasplante de la médula espinal: flucitosina, porque puede perjudicar a la médula espinal; anfotericina B, porque su inherente nefrotoxicidad podría sinergir con lo de la ciclosporina A usada como un inmunosupresante de trasplante.

La profilaxis antimicrobiana en contra de los patógenos oportunistas, descontaminación selectiva de la flora bacteriana intestinal con antibióticos orales no absorbibles, al igual que profilaxis antifúngica, también minimizan las complicaciones post-operatorias (Czirók y cols., 1997).

Las infecciones por *Candida* han sido descritas como complicaciones de otros tipos de cirugía de trasplantes (Scalise y cols., 1989; Wingard y cols., 1993 y 1991), incluyendo trasplante renal (Gallis y cols., 1975; Rifkind y cols., 1967; Chugh y

cols., 1993; Moyses y cols., 1997; Reis y cols., 1995; Burgos Revilla y cols., 1999; Girishkumar y cols., 1999), trasplante de páncreas (Hesse y cols., 1986; Lumbreras y cols., 1995), trasplante de pulmón (Zenati y cols., 1991; Paradis y Williams, 1993; Quabeck, 1994), trasplante de corazón (Hummel y cols., 1992; Galbraith y cols., 1999) y trasplante corazón-pulmón (Brooks y cols., 1985). Han sido también vistas en asociación con los procedimientos de trasplante de hígado (Arnou, 1991; Castaldo y cols., 1991; George y cols., 1992; Afessa y cols., 1993; Cisneros Alonso y cols., 1993; Girishkumar y cols., 1999). Peritonitis candidiásica es una complicación bastante frecuente de continuas diálisis peritoneal ambulatoria (Kerr y cols., 1983; Lavarde y cols., 1984; Digenis y cols., 1990; Yuen y cols., 1992; Shusterman y Jacobs, 1992; Verrina y cols., 1992; Valeri y cols., 1993; Bren, 1998; Qadir y Cunha, 1998; Wong y cols., 2000).

Según Paya (1993) y Moreno y cols., (1994) las infecciones fúngicas invasivas ocurren más frecuentemente en los receptores de trasplante de hígado que en la mayoría de los otros tipos de receptores de trasplante de órgano; además, las infecciones fúngicas invasivas presentan el rango más alto de mortalidad, a pesar de tener una relativa incidencia más baja cuando es comparada con las infecciones bacterianas y virales (Collins y cols., 1994). Según los trabajos de Nieto-Rodríguez y colaboradores, en 1996, la hiperglucemia que requiere insulina y la exposición a más de tres antibióticos son los factores asociados con el desarrollo de la candidemia en receptores de trasplante de hígado. Gladly y cols., 1999, sugieren que entre los factores de riesgo predictivos para una infección invasiva en los receptores de trasplante de hígado en pediatría se encuentran: la terapia antibiótica anterior al trasplante, larga duración de la operación, requerir transfusión, los numerosos días en la unidad de cuidados intensivos, los días que se permanece intubados, número de infecciones bacterianas concurrentes, número de antibióticos suministrados, número de laparatomías realizadas después del trasplante, retrasplante, trombosis de la arteria hepática, pérdida de bilis y fracaso renal y respiratorio.

En los trabajos de Patel y colaboradores, 1996, se concluye que la identificación de los factores de riesgo para cualquier tipo de infección fúngica sugiere que “la profilaxis diana” con antifúngicos específicos sería de un valor más bajo que el número de pacientes que se verían beneficiados, evitando efectos colaterales innecesarios y coste. Su identificación incitaría medidas profilácticas específicas para reducir la mortalidad y morbosidad en esta población. La incidencia de hepatitis fulminante o severa disyunción del hígado antes del trasplante, largos requerimientos de transfusión intratrasplante e infección bacteriana posttrasplante, así como infección sintomática de citomegalovirus dispararían la profilaxis antifúngica específica.

Catéteres intravasculares y nutrición parenteral.

De todos los procedimientos terapéuticos probables de potenciar la infección, la práctica de introducir en un paciente un tubo que conecta sus vasos sanguíneos o tracto urinario directamente con el exterior debe ser considerado uno de los más importantes ejemplos: cuando tales tubos se dejan *in situ* durante mucho tiempo la probabilidad de infección aumenta; y cuando los tubos se llenan con soluciones nutritivas capaces de potenciar la multiplicación de las levaduras, son otras causas que aumentan la probabilidad de infección (Odds, 1988).

En pacientes con sondas urinarias, en los que la colonización por *Candida* está en la punta de la sonda, se han descrito casos de infección del tracto urinario atribuibles a *Candida*. La incidencia incrementada en los últimos años de las infecciones fúngicas del tracto urinario está asociada con el uso extensivo y prolongado de agentes antimicrobianos de amplio espectro, corticosteroides, drogas inmunosupresivas y citotóxicas (Krcmery y cols., 1999; Moulin y cols., 1998; Sobel y Vázquez, 1999). No sorprende, entonces, el uso de catéteres intravasculares - especialmente los de la circulación central y usados para la nutrición parenteral de los pacientes- es asociado con un alto riesgo de candidiasis sistémica y ha sido el objeto de muchas publicaciones (Bjornson y cols., 1982; Bozzetti y cols., 1982; Torres Rojas y cols., 1982; Curry y Quie, 1971; Plouffe y cols., 1977; Taylor y cols., 1994; Harden y cols., 1995; Edgeworth y cols., 1999). Por lo que acorde con los

resultados de diferentes autores se confirma la importancia del catéter intravenoso como uno de los principales factores de riesgo para las infecciones nosocomiales (Nicholls y Morris, 1997; Pittet y cols., 1999; Sitges-Serra y Girvent, 1999). Algunos trabajos, además, muestran que el 41% de la septicemia relacionada con catéter no tiene señales de infección local, pero es la nutrición parenteral la que añade riesgos de septicemia relacionada con catéter (Chiu y col 1997; Stratov y cols., 1998). Williams y colaboradores, en 1971, mostraron elegantemente como la duración de la cateterización vascular se correlaciona linealmente con la prevalencia de la candidemia. Entre otros factores de riesgo que predisponen a las infecciones por el uso de catéteres vasculares podemos citar la frecuente manipulación del catéter, técnicas incorrectas de inserción y mantenimiento, apósitos transparentes de plástico, soluciones de piel contaminadas, la localización del catéter y otros (Raad II, 1994).

Las infecciones primarias del torrente sanguíneo, la neumonía y las infecciones del tracto urinario, a menudo asintomáticas y asociadas con el uso del catéter, representan la gran mayoría de las infecciones nosocomiales (Warren, 1997; Heckmann y cols., 1999; Richards y cols., 1999). La proporción relativa de organismos causantes de infecciones nosocomiales en el sistema sanguíneo ha cambiado en la última década, con el establecimiento firme de las especies de *Candida* como uno de los agentes más frecuentes (Pfaller, 1994 y 1995; Wenzel, 1995; Edmond y cols., 1999; Gumbo y cols., 1999; Rennert y cols., 2000). Entre los factores de riesgo que predisponen a la epidemiología de candidiasis nosocomial podemos incluir inmunosupresión y malignidades, uso de antibióticos de amplio espectro y el uso de catéteres centrales (Wright y Wenzel, 1997; Rodero y cols., 1999).

La sepsis por *Candida* asociada a la cateterización venosa, puede conducir a altas tasas de mortalidad. Los catéteres intravenosos se consideran pues factores predisponentes importantes en numerosas series de casos retrospectivos de candidiasis sistémicas (Stanley y cols., 1994; Salzman y Rubin, 1995; Rodríguez-Tudela y Cuenca-Estrella, 1999).

La distribución de las especies de *Candida*, involucradas en candidemia asociada a catéteres, según Odds (1988), calculada a partir de veinte publicaciones, muestra que *C. albicans* aparece en el 80% de los casos, *C. parapsilosis* en el 12% y *C. tropicalis* en un 5%. En el estudio realizado por Meunier-Carpentier (1981), con datos de una sola institución, encuentra una prevalencia más baja de *C. albicans* (38%). *C. tropicalis* aparece en un 24%, *C. glabrata* en el 21% y *C. parapsilosis* en el 13%.

Algunos de los primeros trabajos sobre candidiasis asociada a nutrición parenteral revelan otras formas adicionales de abusar de la alimentación parenteral como factor predisponente a la candidemia. El trabajo de Freeman y cols., (1972), es un buen ejemplo a este respecto: la más común fue la contaminación por levaduras de las soluciones utilizadas en la nutrición parenteral (Deeb y Natsios, 1972; Freeman *et al.*, 1972) y en dos brotes de septicemia por *C. parapsilosis* aparecieron trazas de contaminación en los tubos (Plouffe y cols., 1977; Solomon y cols., 1984). Hechos que se corroboran con estudios más recientes, como los de Rodríguez-Tudela y Cuenca-Estrella (1999), en los que se considera a la nutrición parenteral uno de los factores asociados con la aparición de fungemia en los últimos años.

Sin duda, *C. albicans* y otras especies de *Candida* de importancia médica pueden crecer en soluciones con altas concentraciones de glucosa, aminoácidos y lípidos y también colonizar fácilmente los catéteres, pero esta fuente de contaminación debería ser ya ser excepcional. Varios informes han mencionado que el riesgo de sepsis asociada a catéter parece elevarse con el tiempo en que se deja *in situ* los catéteres intravasculares (Prager y Silva, 1984; Tsunetzuka y cols., 1998).

Para prevenir la contaminación exógena de catéteres intravasculares, los antisépticos tópicos son preferentemente cremas antibióticas tópicas, puesto que lo último podría actualmente estimular la colonización de *Candida* en el lugar de la cannulación: aún así es posible que la antisepsia local tenga poca eficacia profiláctica. Por supuesto, el manejo de catéteres cerca de la contaminación de la piel en el lugar de entrada predispone que ésta sea la ruta principal por la que se adquiere la septicemia.

Una complicación ocasional de los catéteres intravasculares es el desarrollo de tromboflebitis supurativas. Se conocen casos bien documentados en los cuales están implicados especies de *Candida*. Otra es la posibilidad de émbolos sépticos.

Otros catéteres, prótesis y cuerpos extraños.

Si las dentaduras y los catéteres intravasculares pueden actuar como lugares de colonización por *Candida*, pueden otros objetos inanimados penetrar o permanecer dentro del hospedador. El estado cerrado y líquido dentro de los tejidos irritará el efecto de los objetos extraños. Catéteres intraurinarios (Darouiche y cols., 1997) y prótesis de válvula coronaria son estrechamente asociados con infecciones candidiásicas.

Las poblaciones microbianas que colonizan los dientes representan un origen importante de patógenos responsables de las infecciones orales y dentales, incluyendo enfermedades periodontales, gingivitis, pericoronitis, endodontitis, e infecciones postextracción (Tanner y Stillman, 1993). El fumar cigarros es un factor de riesgo potencial que se ha asociado recientemente con la progresión de la enfermedad periodontal (Kamma y cols., 1999).

Los implantes dentales representan una herramienta crucial y son usados para soportar diferentes sustituciones de dientes, desde uno solo hasta dentaduras completas, por lo que la tecnología se convierte en una atractiva opción para reemplazar dientes perdidos. Aunque la mayoría de los implantes son extremadamente útiles, con rangos de supervivencia superiores al 98% por implantes colocados en clínicas controladas, los implantes pueden fracasar. Las dos razones principales para este fracaso son el estrés mecánico o la infección bacteriana (Becker y cols., 1990). Al igual que las enfermedades periodontales, los implantes pueden ser infectados por diferentes especies que pueden requerir diferentes abordamientos para un tratamiento eficaz (Tanner y cols., 1997).

Penk y Pittrow, 1998, se encontraron con una complicación rara de candidiasis en una intervención ortopédica. Observaron que un elevado número de articulaciones artificiales implantadas, así como un extenso uso de tratamiento agresivo, como: la altas dosis de quimioterapia y nutrición parenteral, el incrementado uso de catéteres venosos central y un amplio uso de drogas inmunosupresoras provocan una incidencia más alta de artritis fúngica, especialmente causada por *Candida*.

Miscelánea de factores predisponentes

Se ha demostrado que la irradiación X produce un aumento de la severidad de las infecciones candidiásicas en animales de experimentación (Lal y cols., 1986) y un incremento del aislamiento de la levadura oral en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Efectos del humo de cigarrillos en candidiasis oral han sido valorados con resultados conflictivos. Arendorf y sus colaboradores, 1983, han mostrado significativamente incrementos en el aislamiento de candidiasis oral entre los fumadores, mientras otros no han encontrado sustanciales diferencias (Oliver y Shillitoe, 1984) y Beasley (1969) describió tres casos de la enfermedad en los que la propia infección coincidía con la interrupción del hábito de fumar de los pacientes.

El número de situaciones que pueden ser causa de incidencia en la predisposición a infecciones por *Candida*, locales o generalizadas, es, como se ve, amplio y variado. Las lesiones superficiales por *Candida* pueden resultar de factores relativamente triviales, tales como llevar dentadura postiza, o bien, como consecuencia de condiciones subyacentes mucho más serias como diabetes o trastornos hormonales. En casos de candidiasis superficiales, especialmente aquellos que no responden a terapia antifúngica, el clínico debería considerar la advertencia de Wilson (1972) en torno al hecho de que la candidiasis puede ser la consecuencia de una enfermedad subyacente y que, por ello, es necesario examinar al paciente para averiguar cual es el origen de la predisposición.

En pacientes hospitalarios graves sometidos a reiterados tratamientos quirúrgicos y farmacéuticos, la posibilidad de una candidiasis sistémica es muy elevada. En todos los casos en que se diagnostica debería suprimirse, tanto como sea posible, todos los factores que puedan potenciar la enfermedad. Muchos casos de infecciones serias por *Candida* se han resuelto rápidamente sin recurrir a terapias antifúngicas, con el simple hecho de retirar los catéteres y suprimir los tratamientos con antibióticos y corticosteroides (Arévalo, 1989).

Finalmente, el hecho de existir tantas situaciones en las prácticas hospitalarias que pueden potenciar una candidiasis, sugiere la necesidad de aplicar medidas profilácticas antifúngicas, en especial con pacientes de riesgo (Arévalo, 1989).

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

I.6.- EL GÉNERO *CANDIDA* Y LA PATOLOGÍA HUMANA.

I.6.1.- FORMAS INFECCIOSAS.

I.6.1.1.- Candidiasis superficiales.

Las candidiasis superficiales pueden ser cutáneas o cutáneo mucosas. Las candidiasis cutáneas incluyen el intertrigo de los pliegues (grandes pliegues, sobre todo, pliegues submamaros en obesos), el intertrigo dígito-palmar y/o dígito-plantal, la perionixis en levaduras y el granuloma por *Candida*. Las candidiasis cutáneo mucosas incluyen a las candidiasis orofaríngeas (muguet, quelitis angular y la lengua negra) y las candidiasis genitourinarias y anales (vulvovaginitis, balanopostitis y manifestaciones perianales). Este tipo de candidiasis afectan a la cavidad oral, genital, la piel y las uñas.

I.6.1.2.- Candidiasis viscerales.

Las candidiasis viscerales incluyen las candidiasis digestivas (localización en esófago y en intestino) y las candidiasis broncopulmonares.

I.6.1.3.- Candidiasis diseminada. Septicemias por *Candida*.

La distinción entre una infección sistémica primaria por *Candida* candidiasis y diseminada (“generalizada” o “septicémica”) es a menudo arbitraria, puesto que la ruta de infección de órganos profundos con *Candida* es a menudo el torrente sanguíneo. El término de “candidiasis diseminada” hace referencia a un proceso infeccioso en el que las lesiones metástasicas por *Candida* surgen en dos sitios diferentes del cuerpo como mínimo (Odds, 1988).

La candidiasis diseminada se puede definir como cualquiera o ambas de las siguientes definiciones:

1. Candidemia sostenida (que sugiere septicemia).
2. Candidiasis en más de un lugar con evidencia de la infección surgió por difusión hematogénea de *Candida*.

La septicemia por *Candida* es una infección que aumenta más cada vez, sobre todo, como acontecimiento terminal de alguna enfermedad fundamental (Bodey, 1984; Horn y cols., 1985; Smith y Congdon, 1985). Ha sido mejor conocida como entidad a finales del siglo XX que en años anteriores a 1960. El informe más antiguo completamente documentado es el de Parrillo, en 1950. Braud y Rock, en 1959, encontraron sólo tres casos publicados anteriormente para revisar; Hurley, cinco años más tarde, hace un listado de 48 casos publicados en su revisión de la literatura mundial en candidiasis diseminada y en los años 70 se publicaron análisis extensivos de largas series de pacientes con candidiasis diseminada con elevada regularidad.

Los trabajos publicados en los años 60 y 70 por varios grupos en USA (Armstrong, Bennett, Bodey y Fainstein, Hughes, Kozinn y Taschdjian, Louria, McMillan y Law y Remington) fueron altamente influyentes en atraer la atención a los problemas causados por las fatales infecciones diseminadas por *Candida* en huéspedes altamente inmunocomprometidos tales como pacientes con cáncer, pacientes con quemaduras y pacientes recuperados de cirugía principal (Odds, 1988). Lelarge y Mariot, 1992, amplían este grupo de pacientes a aquellos que han sufrido alguna complicación en la cirugía, sobre todo, del tracto gastrointestinal y corazón, o cirugía de trasplante (excepto para trasplantes de riñón), o quienes hayan prolongado su estancia en cuidados intensivos. Otros pacientes son los recién nacidos de bajo peso, pacientes hemato-oncológicos, adictos a la heroína y pacientes con SIDA.

Entre las características generales de la candidiasis diseminada destaca una ligera preponderancia de pacientes masculinos. La infección surge en todos los grupos de edad, pero la distribución es más pesada hacia pacientes mayores de 30

años. Malignencias, enfermedades gastrointestinales y hepáticas (incluidos algunos carcinomas) y quemaduras principales emergen como los ambientes más comunes para la candidiasis diseminada. Todos los factores iatrogénicos, con la excepción de la hiperalimentación parenteral, son aplicados al menos a un cuarto de los pacientes. La leucopenia es a menudo citada como un factor predisponente a candidiasis sistémica, pero la infección podría surgir en conjunción con una leucocitosis también: en un cuarto de los casos publicados el paciente tuvo un recuento de leucocitos elevado (Odds, 1988).

Se puede presentar fungemia transitoria después de introducción de catéteres, infusiones intravenosas continuas, o cirugía, o se puede relacionar con catéteres de Foley, o hemodiálisis (Kerr y cols., 1983; Rault), u otras destrucciones de las barreras naturales (Klein y Watanakunakorn, 1979). En la mayoría de los pacientes, los microorganismos se aclaran en forma rápida, pero en personas debilitadas la septicemia suele ir seguida de enfermedad generalizada.

La candidemia persistente o prolongada indica un foco de infección establecido. Esta puede ser complicación del tratamiento por vía intravenosa, diálisis o hiperalimentación parenteral que causa tromboflebitis periférica candidial supurante (Torres Rojas y cols., 1982). Puede resultar oftalmítis u otra enfermedad local, pero la mayor parte de las infecciones se curan con una combinación de 5FC y anfotericina B; algunas veces, se necesita extirpación de la vena trombosada.

Los signos clínicos de septicemia incluyen fiebre, escalofrío y trastorno de la función renal. El índice de mortalidad por colonización generalizada, es alrededor del 56% aún con tratamiento (Rippon, 1988). *C. albicans* se estima por encima de la mitad de los casos y *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* sucesivamente las especies cercanas más comunes implicadas. La “candidiasis” diseminada se trata actualmente de una mezcla de bacterias/levaduras u ocasionalmente una infección moho/levadura en 13% de los casos.

En algunos casos la candidiasis diseminada se presenta después de que un paciente haya sufrido uno o más episodios de septicemia bacteriana. Es para controlar estos episodios de sepsis que los tratamientos prolongados, altas dosis o antibióticos múltiples, los cuales fracasan comúnmente en el ambiente para candidiasis diseminada, son dados. El hecho que la septicemia bacteriana se encuentre a veces simultáneamente con septicemia por *Candida* en la mitad de los casos estudiados por Maksymiuk y col. muestra que, en algunas otras formas de candidiasis, *Candida* se comporta como un invasor secundario causante de infección diseminada. Debido a que algunos pacientes sufren de un episodio de candidemia sólo después de uno o más episodios de bacteriemia, la candidiasis diseminada surge más a menudo en pacientes que han sido hospitalizados e inmunocomprometidos relativamente durante largos períodos. El promedio de tiempo entre admisión/cirugía, procedimiento/cáncer quimioterapia y candidiasis diseminada han sido estimado dentro del rango de 20-35 días en muchos estudios (Faix, 1984; Myerowitz y cols., 1977; Singer y cols., 1977; Solomkin y cols., 1982; Thomas y Lang, 1985; Winston y cols., 1979; Wolfson y cols., 1982) (en pacientes quemados el número de episodios bacteriémicos y el tiempo después de la propia candidiasis diseminada podría ser más grande que en otros tipos de pacientes (Macmillan y cols., 1972).

El rango de mortalidad asociado con casos de candidiasis diseminada es alto. Más de la mitad de los pacientes descritos en la literatura murieron, aunque la candidiasis diseminada no fue la única o el principal agente de la muerte en cada instancia (Taschdjian y cols., 1970; Louria, 1971; Elder y Roberts, 1986; Odds, 1988; Sabaté, 1988; Wenzel y Pfaller, 1991; Bodey y cols., 1992; Anaissie, 1992; Fraser y cols., 1992; Tausch y cols., 1992; León Regidor y cols., 1993).

El uso de drogas tales como antibióticos y agentes citotóxicos y los procedimientos tales como laparotomía y cateterización intravascular son indicadores del estado fundamentalmente clínico del paciente. La magnitud con la que los factores iatrogénicos contribuyen directamente a la propia candidiasis diseminada es difícilmente evaluable. El trabajo de Marsh y cols., muestra (en pacientes quirúrgicos) que los antibióticos, esteroides y hiperalimentación parenteral sólo o en combinaciones apareadas no fueron factores de riesgo estadísticamente significativas

en candidiasis diseminada: fue la combinación de los tres factores en un solo paciente lo que creó un riesgo significativo.

Por todo, los informes de algunos casos y series de candidiasis diseminada, fiebre (superior a 38 °C) es el único carácter presente más común de la infección. La fiebre podría ser continua, undulante o punteada, y en unos pocos casos está acompañada por escalofríos. Hipotensión, taquicardia y disfunción respiratoria son también comunes: en casos severos el paciente presenta una conmoción (Zouaghi y cols., 1983). Las señales específicas raras, tales como la piel con erupciones, mialgias y endoftalmitis por *Candida*, son discutidas.

Leucopenia es el ambiente para candidiasis diseminada principalmente en pacientes con cáncer, como resultado de la terapia con agentes citotóxicos. Los hemocultivos positivos se encuentran en alrededor del 60% de los casos de candidiasis diseminada, indiferente del ambiente de la enfermedad, y cultivos positivos de orina para *Candida* son menos comunes. La mortalidad asociada con candidiasis diseminada es, probablemente, más alta siempre porque la infección sólo surge en aquellos en la que la enfermedad subyacente está ya asociada con un pronóstico grave. Sin embargo, probablemente, la candidiasis diseminada exagera las tendencias de la mortalidad subyacente y las formidables dificultades de diagnóstico y tratamiento de la infección crean obstáculos sustanciales para revocar este efecto (Odds, 1988).

I.6.2.- FORMAS ALÉRGICAS.

La alergia a los metabolitos producidos por *Candida* es un fenómeno bien establecido, y el cuadro clínico se denomina candidide. Esta reacción es similar a la dermatofítide de la infección por tiña, tanto en su aspecto como en su génesis. No está bien comprobado el papel de *Candida* en otros síndromes que causan hipersensibilidad. Entre éstos se incluyen eccemas, asma (Drouet, 1985), gastritis y un trastorno del ojo parecido a la llamada uveítis por histoplasma. Los productos extracelulares de *Candida* pueden provocar tanto tipos retardados como inmediatos de hipersensibilidad. La mayoría de los adultos que presentan síntomas de infección

o de alergia reaccionan a la inyección intradérmica de un filtrado de cultivo de *C. albicans* denominado Oidiomicina (Hollister-Stier). Esto indica que el material antígeno del microorganismo, o que el mismo microorganismo pueda pasar a través de la pared de la mucosa en cantidad suficiente para provocar respuesta inmunológica. En consecuencia, es probable que la colonización de los bronquios o de algún tejido cutáneo dañado con anterioridad, por *Candida*, o que el crecimiento excesivo del microorganismo en su hábitat normal se podría acompañar de manifestación de toxicidad y alergia (Rippon, 1988).

I.6.2.1.- Alergias cutáneas.

Las indicaciones más cercanas de alergia a *Candida* fueron publicadas a finales de los años 1920 (Frost y cols., 1929; Ramel, 1925 y 1926; Ravaut y Rabeau, 1928 y 1929). Estos fueron casos de reacciones de piel estériles, paraqueratóticas de los brazos, muslos o cara y de los lugares remotos de una infección superficial por *Candida*. Las infecciones se llamaron “levadurides” y “moniliatides” por analogía con la dermatofitides vista a veces en casos de círculo de gusano y los nombres de “monilides” y “candídides” fueron extensiones de esos nombres en inglés. Las reacciones se han observado en casos de candidiasis primaria oral, cutánea y gastrointestinal y ellos sugieren que los anticuerpos sensibilizados formados en respuesta a una infección local de *C. albicans* podría afectar a las células por sí mismas. Las reacciones por *Candida* pueden ser paraqueratóticas, papular o eczematosas (Hozen, 1973; Winner y Hurley, 1964).

Las lesiones de candídides son parecidas en su aspecto clínico, morfología y distribución a las de dermatofitides, son lesiones vesiculares (tipo ponfólix) estériles, agrupadas, que se pueden presentar en los espacios interdigitales de manos o en cualquier parte del cuerpo. Al igual que las dermatofitides, desaparecen después de la resolución de la infección por *Candida*, o después de la desensibilización (Rippon, 1988).

I.6.2.2.- Eccema, asma y gastritis.

Se ha descrito alergia cutánea en forma de urticaria y de eccema (Sclafer, 1956 y Sclafer y Hewitt, 1960) después de candidiasis. Asimismo se ha descrito alergia a *Candida* en las formas de uretritis, gastritis, balanitis, rinosinusitis, cefalea y otros síntomas vagos (Crook, 1986; Mayser, 1999).

El interés experimental en alergia por *Candida* ha sido bajo durante algunos años y no parece probable que las especies de *Candida* causen más que una pequeña proporción de las conocidas reacciones tipo I en humanos.

No hay dudas que *C. albicans* tienen componentes antigénicos capaces de estimular las respuestas de inmediata hipersensibilidad en animales. Los componentes de la pared celular del hongo pueden estimular descarga de histamina de células aisladas de rata *in vivo* y anticuerpos IgE en ratón. Las respuestas tipo I en humanos requiere de un complemento normal de linfocitos.

Algunas publicaciones sostienen el papel de un alérgeno potencial respiratorio para *Candida*, aunque los pocos informes de candidiasis broncopulmonar alérgica no son notables (Akiyama y cols., 1984; Kabe y cols., 1971; Robinett, 1968). Raramente las condiciones tales como “la tos del catador de té” (Castellani, 1912) y “el pulmón del trillador” (Zettergren, 1950), una vez asociados con *Candida*, son más probables de ser alergias de levaduras en las que *Candida* aparece como un compañero no implicado o al menos una irritación de alergia respiratoria (Winner y Hurley, 1964). Plummer, en 1966, comentó como *C. albicans* raramente ha sido incriminada como un alérgeno respiratorio y no se imaginó que fuera a ser considerada como una causa de asma (Plummer, 1966). Sandhu y cols., diagnosticó 13 casos de asma por *Candida*, pero sólo entre 407 pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (Sandhu y cols., 1979).

I.6.2.3.- Alergia en otros sitios.

La alergia vaginal a *Candida* podría ser una explicación para algunos casos de candidiasis crónica vulvovaginal (Kudelko, 1971; Mathur y col 1977; Siegel, 1986; Tomsiková y cols., 1980; al-Rawi y Kavanagh, 1999). Holti describió una elevada prevalencia de hipersensibilidad cutánea tipo I y respuesta clínica a nistatin oral entre los pacientes con colitis mucosa (“Síndrome del colon irritable”) (Holti, 1966) y Alexander ha publicado que *C. albicans* puede causar alergia en el intestino largo (Alexander, 1975). Alergia a *Candida* se ha mencionado como causa de pruritis anal (Holti, 1966).

I.7.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *CANDIDA*.

Adquirir y mantener experiencia en identificar organismos importantes clínicamente ha sido la meta de los laboratorios clínicos durante décadas. Desde los primeros años de los métodos de diagnóstico en Microbiología hasta los años 60, cuando los avances en identificación microbiológica empiezan a emerger, el conocimiento en el juicio interpretativo y el uso de medios en tubos y placas fueron la base de la identificación. Los organismos fueron identificados con aquellos métodos que en la actualidad denominamos como procedimientos convencionales, los cuales incluyen reacciones en medios de tubos y observación de características físicas, tales como la morfología de la colonia y olor, unido con los resultados de la tinción de Gram, pruebas de aglutinación y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Estos métodos convencionales eventualmente definían los géneros y las especies de levaduras y se recurría al método de referencia para confirmar los aislamientos (Miller y O'Hara, 1999).

Aunque las estrategias convencionales para la identificación aún son válidas y útiles, ahora hay otras disponibles. Con la introducción de pruebas “convencionales modificadas” y pruebas rápidas con enzimas con sustratos cromógenos a fines de la década de 1960, el desarrollo de sistemas de preparados comerciales, los “métodos rápidos” y “los informes rápidos” se han transformado verdaderamente en un objetivo factible para los laboratorios de microbiología clínica (Buesching y cols., 1979; Miller, 1991; Pfaller, 1993; Schffenecker y cols., 1993). Estos métodos no sólo han disminuido el tiempo de espera de los resultados para los pacientes sino que han incrementado la relevancia clínica de la información provista por cada laboratorio (Koneman y cols., 1999).

El siguiente paso en la evolución de los métodos de identificación miniaturizados usó, comúnmente, las reacciones bioquímicas en un formato más conveniente (Hartman, 1968). En una metodología dependiente de un sistema, una serie de sustratos son seleccionados cuidadosamente, lo que permitirá aparecer un

modelo de reacción positiva y negativa, creando un perfil metabólico posible de comparación con un perfil establecido en la base de datos (Miller y O'Hara, 1999).

Los perfiles bioquímicos son determinados por las reacciones de organismos individuales con cada uno de los sustratos en el sistema. La exactitud de las reacciones depende del seguimiento del usuario de las directrices del fabricante con relación a la preparación y densidad del inóculo, condiciones de incubación e interpretación del ensayo. La mayoría de los sistemas cuentan con cambios de pH resultante de la utilización de sustrato, reacciones enzimáticas que permiten el relajamiento de componente cromogénico o fluorogénico, indicadores de actividad metabólica de tetrazolio basados en la presencia de una variedad de fuentes de carbono, detección de ácidos volátiles o no volátiles o reconocimiento del crecimiento visible. Las pruebas adicionales para la identificación microbiana que usan otras formas de detectar una respuesta positiva para un sustrato dado podrían también ser incluidas (Miller y O'Hara, 1999).

Aunque la definición no formal de "rápido" existe para describir el tiempo requerido para que se generen los resultados, la mayoría de los microbiólogos esperan sistemas rápidos que suministren resultados útiles dentro de 2 a 4 h de incubación. Claramente, los tiempos de generación de los organismos (normalmente, 30 min. o más) no permitirá los métodos dependientes del crecimiento para generar respuestas bioquímicas detectables en este tiempo. Para salvar el problema de los tiempos de generación, los fabricantes de sistemas rápidos utilizan sustratos nuevos en los que las enzimas producidas por los organismos que van a ser testados, podrían reaccionar para deducir respuestas detectables dentro de 2 a 4 horas (Miller y O'Hara, 1999). En este sentido, el uso de pruebas con sustratos cromógenos de enzimas permite al laboratorio identificar con certeza y rápidamente muchas especies de microorganismos. Los sustratos cromógenos de enzimas detectan enzimas preformadas y permiten la identificación de microorganismos específicos en comparación con el crecimiento en medios selectivos o diferenciales, de las características de las colonias y la morfología celular en un extendido teñido con coloración de Gram. Estas nuevas pruebas podrían emplearse, junto con las

tradicionales para proveer identificación presuntiva y certera de microorganismos clínicamente significativos (Koneman y cols., 1999).

En la actualidad las pruebas que emplean sustratos cromógenos y pruebas “convencionales” modificadas han sido combinadas en sistemas comerciales que permiten la identificación de una variedad de especies. Estos sistemas son de uso corriente en laboratorios clínicos de todo el mundo. Este estado de la tecnología se encuentra dirigido a proveer identificaciones rápidas, estandarizadas y reproducibles (Koneman y cols., 1999).

Los sistemas de identificación microbianos son considerados como manuales o automatizados. Los métodos manuales ofrecen las ventajas de usar los conocimientos analíticos de los técnicos para la lectura e interpretación de las pruebas, mientras que los sistemas automatizados ofrecen el disponer de un trabajo menos laborioso, lo que permite a los técnicos más tiempo para otros deberes. Para todos los sistemas, la espina dorsal de la exactitud del resultado es la solidez y utilidad de la base de datos (Miller y O’Hara, 1999).

Las compañías comerciales han introducido diversos equipos para la identificación de levaduras, como son el API 20C®, el Vitek®, el sistema RapID Yeast Plus System®, el BactiCard Candida®, Murex *C. albicans*®, CHROMagar®, entre otras.

I.7.1.- MEDIOS DE CULTIVOS PARA AISLAMIENTO.

El medio más popular y utilizado para el aislamiento primario de las especies patógenas de *Candida* es el agar glucosa-peptona descrito por vez primera por Sabouraud en 1894 y conocido como el agar Sabouraud. Este medio tiene un pH inferior a 6, no permitiendo el crecimiento de algunas bacterias. Para el aislamiento de levaduras, el crecimiento bacteriano en agar Sabouraud se puede suprimir añadiendo antibióticos antibacterianos al medio. Cloranfenicol, penicilina y estreptomycinina son los más comunes.

El agar de Sabouraud (AS) es el medio más usado para el aislamiento de *Candida* y otras levaduras de origen clínico (Odds, 1991), medio general que soporta el crecimiento de la mayoría de los hongos patogénicos. No es un medio diferencial y las colonias de diferentes levaduras patógenas que crecen en este agar no pueden ser fácilmente distinguibles entre sí. Observadores cuidadosos, a menudo, son capaces de reconocer mezclas de diferentes levaduras, pero la ausencia de alguna propiedad diferencial indicadora en el agar no garantiza que los cultivos con mezclas de levaduras sean detectados (Odds y Bernaerts, 1994).

I.7.2- FILAMENTACIÓN EN SUERO.

El método tradicional más específico para la identificación de *C. albicans* es el tubo germinativo, que se caracteriza por la producción de hifas a partir de las blastosporas cuando son incubadas a 37 °C en suero durante 2-3 h. (Landau y cols., 1965; MacKenzie, 1962; Haley y Callaway, 1978; McGinnis, 1980; Saubolle, 1984). Reynolds y Braude fueron los primeros en descubrir que los componentes de la sangre estimulaban la formación de la hifa en *C. albicans*. En 1969 Taschdjian, Burchall y Kozinn introdujeron la técnica de la filamentación de *C. albicans* cuando crece en suero o sustitutos (Taschdjian y cols., 1960). Demostraron que con esta técnica puede identificarse rápidamente y con fiabilidad la especie *C. albicans*. Desde entonces, se ha generalizado el uso de la misma en los laboratorios médicos microbiológicos.

La filamentación en suero es una prueba simple, eficiente y económica, útil para el laboratorio en la identificación de *C. albicans* (Mackenzie, 1962; Sandven, 1990; Fenn y cols., 1996; Heelan y cols., 1996; Hoppe y Frey, 1999). Sin embargo, alrededor del 5 % de los aislamientos de *C. albicans* producen falsos negativos y algunos aislamientos no *C. albicans* falsos positivos (Salkin y cols., 1987; Grillot, 1996). La habilidad de *C. albicans* de producir tubo germinativo se ve afectada por las condiciones ácidas del medio, contaminación bacteriana, temperatura e inoculación (Hasenclever, 1977; Hrmová y Drobnica, 1981; Kwon-Chung y Bernet, 1992; McGinnis, 1980). Un técnico con poca experiencia podría confundir la germinación de artroconidia producida por *Geotrichum* y *Trichosporon spp.* con la producción del tubo germinativo de *C. albicans* o identificar erróneamente las blastosporas elongadas, todavía agarradas a las células de las levaduras, como tubos germinativos positivos (Auger y Joly, 1977; McGinnis, 1980).

I.7.3.- TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICAS.

En general, los caracteres bioquímicos de las levaduras son considerados como elementos taxonómicos de valor, si bien no del todo definitivos. Así Kreger-van Rij (1969), considera la fermentación y utilización de azúcares como criterio fisiológico principal para la clasificación. Lodder (1970), da también una gran importancia a las propiedades bioquímicas en la determinación específica de las levaduras. Sin embargo, cada día se extiende más el criterio de asociar otros caracteres para llegar a una identificación más exacta.

La asimilación del sustrato está basado en el desarrollo del crecimiento de un organismo en presencia de sustratos químicamente puros y se trata de un método convencional usado para la identificación de levaduras. Wickerham y Burton demostraron la utilidad de las técnicas de asimilación para la clasificación de levaduras en 1948, simplificándose en 1975. El incremento de la incidencia de las infecciones por levaduras entre los pacientes inmunocomprometidos demandó simplificar los métodos de identificación, lo cual permitió desarrollar varios métodos comerciales durante mediados de los setenta. Por lo tanto, para la identificación de las levaduras, basándose en la fermentación y asimilación de carbohidratos, existen diferentes sistemas que a partir de métodos clásicos se han ido sucediendo, con distintas variaciones, en el intento de reducir los inconvenientes que se presentan. Tales son, el gran período de tiempo requerido para montar la prueba y, sobretodo, la duración del período necesario para la lectura correcta, llegándose así a otros sistemas miniaturizados de diagnóstico rápido.

I.7.3.a.- API 20C®.

El sistema API 20C® (bioMérieux Vitek®, Inc., Hazelwood, Mo. USA) se caracteriza por presentar bandas que contienen reactivos deshidratados suficientes para 19 pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos, para determinar la presencia de ureasa y nitrato reductasa y una celdilla control. Los aislamientos se escogen de placas de crecimiento de dextrosa de Sabouraud de 24 o 48 h y se añaden al medio de base para constituir una suspensión de grado 1 de la escala de

Wickerham. Las cúpulas son completadas con las suspensiones. Las reacciones de fermentación para la sacarosa, glucosa y celobiosa se realizan en paralelo para cualquier aislamiento. Se procede a la incubación a 30 °C y se realiza la lectura del crecimiento (turbidez) a las 24, 48 y 72 h, hasta que la identificación final sea descrita como excelente, muy buena o aceptable (El-Zaatari y cols., 1990; Land y cols., 1991; Dooley y cols., 1994; Fenn y cols., 1994; Marler y Eriquez, 1995; Espinel-Ingroff y cols., 1998).

I.7.3.b.- API 20 C Aux®.

El API 20 C Aux ® (bioMérieux-Vitek®, Hazelwood, Mo., USA) es un sistema de identificación de levaduras que se compone de 20 cúpulas conteniendo sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación (carbohidratos y glicerol). Las cúpulas son inoculadas con un medio mínimo semisólido y las levaduras se reproducen sólo si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Las lecturas de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento tras 72 h de incubación y la identificación se obtiene mediante el Catálogo Analítico o un programa informático de identificación (bioMérieux S.A.; Pfaller y cols., 1988; Verweij y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999).

I.7.3.c.- API ID 32 C®.

Producto comercial de la firma bioMérieux S.A. El sistema API ID 32 C es una galería de 32 cúpulas que permite realizar 29 pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), una prueba de asimilación con un control negativo, una prueba de susceptibilidad (cicloheximida) y una prueba colorimétrica (esculina) (Gutiérrez y cols., 1994). Incluye una base de datos con 63 especies diferentes y se procede a la lectura de los resultados después de 48 h de incubación a 30 °C (Fricker-Hidalgo y cols., 1996; Latouche y cols., 1997; Buchaille y cols., 1998; Verweij y cols., 1999) o de forma visual, comparando con el control (O) y anotar todas las cúpulas que aparezcan con turbidez como positivos (bioMérieux S.A.).

I.7.3.d.- API Candida System®.

API Candida System® (BioMérieux®, Marcy-l'Étoile, Francia) ha sido desarrollado para la identificación de las levaduras de mayor relevancia clínica (15 especies) de 18 a 24 h. Consiste en una banda de 10 tubos que permiten 12 pruebas colorimétricas: 5 pruebas de acidificación de carbohidratos (glucosa, galactosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa) y 7 pruebas enzimáticas (β -maltosidasa, α -amilasa, β -glucuronidasa, hidrólisis de urea, N-acetil- β -glucosaminidasa y β -galactosidasa). Después de 18-24 h de incubación a 35 °C, las reacciones se leen visualmente con la adición de los reactivos. Los resultados se transforman en un perfil numérico, que es comparado con el listado suministrado por el fabricante (Fricker-Hidalgo y cols., 1996; Bernal y cols., 1998; Buchaille y cols., 1998; Campbell y cols., 1999; Paugam y cols., 1999; Verweij y cols., 1999).

I.7.3.e- Vitek Yeast Biochemical Card®.

El Vitek Yeast Biochemical Card ® (YBC) (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo) es un sistema automatizado útil en la rápida identificación de levaduras (48 h) clínicamente importantes. Consiste en una tarjeta de plástico con 30 pocillos, 26 de los cuales son pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles negativos. Se usa en conjunción con un sistema automatizado, que incluye un ordenador programado, incubador lector, módulo envase, módulo sellador y la impresora (El-Zaatari y cols., 1990; Liao y cols., 1992; Dooley y cols., 1994; Fenn y cols., 1994; Latouche y cols., 1997; Schulz y cols., 1997; Verweij y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999).

La tarjeta de plástico se incuba a 30°C durante 24 o 48 h, dependiendo de las lecturas realizadas por el aparato. Las tarjetas son leídas de forma automática, analizándose los modelos bioquímicos por medio de una base de datos. Las identificaciones consisten en la conversión de los resultados de las pruebas bioquímicas en nueve dígitos, comparándose con los códigos de la base de datos del ordenador. Las respuestas se expresan en una o más posibilidades; siendo

considerada la correcta identificación de la levadura la probabilidad de 85 % o superior.

I.7.3.f.- Auxacolor®.

El Auxacolor ® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette) es un sistema de identificación basado en el principio de asimilación de azúcares. El crecimiento de las levaduras se visualiza por el cambio de color de un indicador de pH. Consiste en una galería con 16 celdillas. La primera es un control negativo, que facilita la lectura de los resultados de la utilización de azúcares; las siguientes 13 celdillas contienen los siguientes azúcares: glucosa (control positivo), maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa, rafinosa, inositol, celobiosa, trehalosa, adonitol, melecitosa, xilosa y L-arabinosa, respectivamente. Las últimas dos celdillas contienen una solución para la resistencia de actidiona y otra para la detección de la actividad fenoloxidasa de *Cr. neoformans*.

Cualquier azúcar es deshidratado en presencia de una solución básica y un pH indicador, bromocresol púrpura (Milan y cols., 1997). El crecimiento de la levadura se indica por el cambio de color del indicador de azul a amarillo, y el desarrollo de turbidez en la celdilla. La resistencia a la actidiona se refleja por el crecimiento y el cambio de color del indicador de óxido-reducción de azul a rosa o incolora. La actividad de fenoloxidasa se determina por el cambio de color observado (verde o marrón) en el pocillo. La identificación final se basa en la combinación de las pruebas bioquímicas con criterios morfológicos y fisiológicos: pigmentación, artrósporas, cápsula, micelio/pseudomicelio, clamidosporas y crecimiento a 37°C (Korth y Pulverer, 1971; Huppert y cols., 1975; Cooper y Silva-Hunter, 1985; Lavarde y cols., 1990; Dupont y cols., 1991; Davey y cols., 1995; Fricker-Hidalgo y cols., 1995; Hantschnke, 1996; Willemsen y cols., 1997; Buchaille y cols., 1998; Sheppard y cols., 1998; Campbell y cols., 1999; Paugam y cols., 1999; Sheppard y cols., 1999; Verweij y cols., 1999; Romney y cols., 2000; Sanofi Pasteur).

I.7.3.g.- Quantum II Yeast Identification System®.

Quantum II Yeast Identification System ® (Abbott Laboratories, Irving, Texas, USA) es un microprocesador basado en un sistema espectrofotométrico para la identificación de aislamientos de levaduras clínicas dentro de 24 h de inoculación. Consiste en una cámara de plástico que contiene 20 sustratos bioquímicos liofilizados, un cartucho perforador multipunzones y un fotómetro de longitud de onda dual que mide los cambios colorimétricos en las cámaras. Las lecturas de las pruebas bioquímicas se interpretan automáticamente por el fotómetro y comparadas con una matriz de probabilidad establecida por un microcomputador interno. Los resultados bioquímicos, número de código, la identificación más probable e información adicional son imprimidos automáticamente (Sekhon y cols., 1980; Kiehn y cols., 1985; Salkin y cols., 1985; Land y Salkin, 1987; Pfaller y cols., 1988).

I.7.3.h.- Biolog MicroStation System®.

El Biolog MicroStation ha sido diseñado para proveer a los microbiólogos con un sistema versátil que pueda identificar bacterias y levaduras de importancia ambiental, médica y veterinaria. En adición a su potencial de identificación, el sistema puede ser usado para estudiar las capacidades metabólicas y dirigir el tipado de la estirpe debido al extenso número de sustratos que pueden ser testados (McGinnis y cols., 1996). Este sistema usa 94 pruebas bioquímicas para distinguir los diferentes taxones de levaduras contenidos dentro de la base de datos. Es similar al Vitek® (El-Zaatari y cols., 1990) en que ambos miden la habilidad de los aislamientos en usar los sustratos para crecer y el suministrar una identificación general computarizada.

El MicroStation consiste en un ordenador personal IBM y en un lector de microplacas. La base de datos contiene 267 especies de levaduras clasificadas en 53 géneros, conocidos por estar en el ambiente. Algunos de estos taxones han sido documentados como patógenos humanos y animales, especialmente en individuos inmunocomprometidos (McGinnis y cols., 1996).

I.7.3.i.- Uni Yeast-Tek System®.

Uni Yeast-Tek System® (Flow labs, Inc., MacLean, VA) es un método comercial semi-automatizado usado para la rápida identificación de levaduras médicamente importantes, basado en la asimilación y fermentación de siete sustratos carbohidratos (Bowman y Ahearn, 1975 y 1976; Cooper y cols., 1978; Ngui Yen y Smith, 1978;. Weyman y cols., 1979; Baker y cols., 1981; Bergan y cols., 1982; Dermoumi, 1982; Fuchs y cols., 1982; Wehrspann, 1982; Russolo y cols., 1984; Qadri y cols., 1986; Lin y Fung, 1987; Salkin y cols., 1987; Moghaddas y cols., 1999).

El Uni Yeast-Tek System® consta de 11 celdillas que son inoculadas con la suspensión de levaduras e incubadas a 30 °C. El crecimiento se detecta por el cambio de color de los indicadores de pH. La identificación final se basa en la combinación de las pruebas bioquímicas con características morfológicas (pseudohifas, blastoconidias y artroconidias) observadas microscópicamente. Los resultados se transforman en un perfil numérico, de cuatro dígitos, que es comparado con el listado suministrado por el fabricante (Salkin y cols., 1987).

I.7.4.- TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BASADAS EN LA DETECCIÓN ENZIMÁTICA.

La rápida identificación de *C. albicans* es de gran importancia en el aislamiento de levadura patógena, de ahí la importancia de poder disponer de métodos para su rápida identificación. Algunas técnicas han sido comercializadas, basadas en la detección colorimétrica (fluorogénica ó cromogénica) de las enzimas L-prolina aminopeptidasa y β -galactosaminidasa en células de levaduras crecidas en un medio de cultivo y están basadas en el principio de que *C. albicans* produce ambas enzimas mientras que otras levaduras producen sólo una o ninguna de las enzimas. La detección de la L-prolina aminopeptidasa en unión con la β -galactosaminidasa proporciona más especificidad que el medio cromogénico que sólo detecta la enzima β -galactosaminidasa.

Estos métodos se realizan con las colonias después de un aislamiento en un medio convencional, entre los que cabe destacar.

I.7.4.a.- RapID Albicans®.

RapID Albicans® (Biolife®, Italia), es un micrométodo que usa como sustratos el 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosaminida y p-dimetilcinamaldehído, con un período de 2 h de incubación a 37 °C. Para su lectura es necesario el empleo de una lámpara de luz ultravioleta. Se trata de un sistema eficiente para el diagnóstico rutinario de laboratorio y de mayor rapidez que el tubo germinativo (Freydière y Guinet, 1997).

I.7.4.b.- BactiCard™ Candida®.

BactiCard™ Candida® (Remel®, Kansas, USA) también usa como sustratos el 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-galactosaminida y p-dimetilcinamaldehído. Es un método empleado para la identificación presuntiva de *C. albicans* por la detección de L-prolina aminopeptidasa (PRO) y β -galactosaminidasa (MUGAL), exclusivo de esta especie. El BactiCard™ Candida consiste en dos pruebas por separado para PRO

y MUGAL. 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosaminida en presencia de la enzima β -galactosaminidasa libera 4-metilumbeliferona, que es un componente altamente fluorescente detectable por medio de una lámpara de luz ultravioleta. L-prolina aminopeptidasa hidroliza a L-Prolina- β -naphtilamida y reacciona con el revelador de color dando un color rojo (Remel, 1993; Crist y cols., 1996; Heelan y cols., 1996; Freydière y Guinet, 1997; Carrillo-Muñoz y cols., 2000).

I.7.4.c.- Albistrip®,

Albistrip® (Laboratories M. Ltd ®, Bury, Reino Unido) es un medio fluorogénico que usa como sustratos al 4-Metilumbeliferil-N-acetil- β -galactosaminida (NAG) y Prolina-p-nitroanilida (PRO). La producción de una inmediata luz fluorescente azul brillante en la banda de NAG y un color púrpura en la banda de PRO al añadir el inóculo bajo una luz ultravioleta dentro de un período de 30 seg., se considera como resultado positivo. Si ambas bandas resultasen positivas, el organismo se considera *C. albicans*. (Dealler, 1991; Freydière y Guinet, 1997).

I.7.4.d.- Albicans-Sure®.

Albicans-Sure® (Clinical Standards Laboratories®, Inc., California, USA) se trata de un método que consiste en una tarjeta con dos círculos designados A (círculo azul) y B (círculo rojo). El círculo A contiene el sustrato 4-Metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosamina (NAG) y el círculo B contiene prolina-p-nitroanilida (PROL). Se incuba durante 5 min., a temperatura ambiente, después de añadirse los correspondientes reactivos se procede a ver los resultados con una lámpara de luz ultravioleta. Se interpreta como positivo un azul-blanco fluorescente, el 4-metilumbeliferona, para la enzima β -galactosaminidasa; un precipitado azul presente en el círculo B se interpreta como una reacción positiva para la enzima L-prolina aminopeptidasa (Crist y cols., 1996; Heelan y cols., 1996; Freydière y Guinet, 1997).

I.7.4.e.- MUAG® Candi Kit.

MUAG® (Biolife®, Italia), usa como sustrato fluorogénico el 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-galactosaminida. Se suspende colonias de levaduras cultivadas en agar de Sabouraud con cloranfenicol, produciéndose la hidrólisis de la enzima β -D-galactosaminida de *C. albicans* con la liberación de 4-metilumbeliferona. La técnica tiene un tiempo de espera de 3 min., temperatura ambiente y luego su lectura requiere luz ultravioleta. Este método es una técnica alternativa al tubo germinativo en la identificación de *C. albicans*, debido a la existencia de los falsos negativos (Maddocks y Greenan, 1975; Bobey y Ederer, 1981; Perry y Miller, 1987; Dalton y cols., 1989; Molina y cols., 1989; Willinger y cols., 1994; Simpanya, 1995; Freydière y Guinet, 1997).

I.7.4.f.- MUREX *C. albicans* 50®

MUREX *C. albicans*® (Murex Diagnostics®, Inc., Norcross, Ga., USA) es un ensayo desarrollado para la identificación presuntiva de *C. albicans*. Tiene un tiempo de procesado de 30 min. y está basado en la detección colorimétrica de las dos enzimas producidas por *C. albicans*, L-prolina-aminopeptidasa y β -galactosaminidasa. El desarrollo del color amarillo indica hidrólisis de p -nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosaminida (NGL), como consecuencia de la liberación del p -nitrofenol, da como positiva la reacción para la β -galactosaminidasa. El color rojo rosado indica la hidrólisis de L-prolina- β -naphthilamida (PRO) para una reacción positiva para la enzima L-prolina aminopeptidasa (Crist y cols., 1996; Heelan y cols., 1996; Fenn y cols., 1996; Freydière y Guinet, 1997; Hoppe y Frey, 1999).

I.7.4.g.- Rapidec albicans®.

Rapidec Albicans® (API-bioMérieux®, Lyon, Francia) es un micrométodo estandarizado que separa *C. albicans* de otras especies de levaduras dentro de 2 h, detectando las actividades de la hexosaminidasa y prolina aminopeptidasa de los aislamientos (Quindós y cols., 1993). Consiste en cuatro pocillos: el pocillo C es el control de turbidez a 4 de McFarland; en el pocillo S se coloca la suspensión de

levadura y los pocillos 1 y 2 contienen los sustratos para la detección de la actividad de la hesosaminidasa y prolina aminopeptidasa. El ensayo se lee bajo luz ultravioleta de 345 nm y se interpreta acorde a las instrucciones del fabricante, con lo que la presencia de fluorescencia en los pocillos que contienen los sustratos enzimáticos verifica la identificación de *C. albicans* (Fricker-Hidalgo y cols., 1992).

I.7.4.h.- *Candida albicans* Screen®.

El *Candida albicans* Screen ® (CAS; Carr-Scarborough Microbiologicals, Inc., Estofe Mountain, Ga.) se basa en la alteración de un sustrato prueba y la adición de un segundo sustrato combinado en un tubo de reacción y produciendo un resultado colorimétrico más que fluorimétrico (Perry y cols., 1990). Este ensayo está basado en una detección colorimétrica de dos enzimas: L-prolina aminopeptidasa y β -galactosaminidasa. Los sustratos p -nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosaminida (NGL) y L-prolina β -naftilamida (PRO) se combinan en un tubo que contiene 0,30 ml de líquido, donde se suspenden las colonias de levaduras a identificar. El desarrollo de un distintivo amarillo, después de añadir los reactivos, indica una reacción NGL positiva. Un resultado PRO positivo se reconoce por el desarrollo de un color rosa a rojo en la parte alta del líquido. Una reacción positiva para NGL y PRO se considera presuntiva para la identificación de *Candida albicans*.

I.7.4.i.- Fungichrom I®.

El Fungichrom I® (International Microbio, Francia) es un método que consiste en un panel de 16 pocillos en el que se producen cambios de color interpretables después de la incubación a 30 °C de 24 a 48 h, una vez que el crecimiento del pocillo control sea positivo y añadiéndose, a continuación, NaOH 0,1 N en el pocillo que contiene N-acetil- β -D- galactosaminida-paranitrofenil (NAGA) (Buchaille y cols., 1998; Paugam y cols., 1999).

I.7.4.j.- Fungifast I Twin®.

El Fungifast I Twin (International Microbio, Francia) consiste en 10 cúpulas. Los resultados se leen de forma visual después de la incubación a 37 °C de 24 a 48 h, cuando la cúpula control presente crecimiento positivo, añadiéndose después en el pocillo que contiene N-acetil- β -D-galactosaminida-paranitrofenil (NAGA) NaOH 0,1 N. Además, son necesarias características morfológicas para establecer el perfil numérico (Buchaille y cols., 1998; Michel y cols., 1997; Paugam y cols., 1999).

I.7.5.- TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS.

I.7.5.a.- Fongiscreen 4H®.

Fongiscreen 4 H ® (Sanofi Diagnostics Pasteur, París, Francia) es un método empleado para la identificación de *Candida albicans*, además de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *Crypt. neoformans* dentro de 4 h, detectando la reducción de trifeniltetrazolium y ureasa, actividad de galactosaminidasa, α -glucosidasa y L-histidina aminopeptidasa (Quindós y cols., 1993; Hoppe y Frey, 1999).

La técnica incluye seis sustratos deshidratados: medio clorado de trifeniltetrazolio, medio para la detección de la actividad de prolina-aminopeptidasa, medio urea-trehalosa (producción de ureasa) y medio para la demostración de galactosaminidasa, " -glucosidasa y L-histidina aminopeptidasa. Para la identificación de otras especies de levaduras se requieren de otras pruebas adicionales, como asimilación de azúcar, fermentación y morfología en agar Tween 80. La lectura del color de las reacciones desarrolladas se interpretan según las instrucciones del fabricante.

I.7.5.b.- API Yeast Ident System®.

El API Yeast Ident system® (Analytab Products, Plainview, New York, USA) se caracteriza porque las enzimas de las levaduras separan los componentes cromogénicos de los sustratos unidos al cromógeno específico. Los cambios de color en las celdillas se leen manualmente y se interpretan como un resultado positivo (Pfaller y cols., 1988). Se caracteriza por presentar un período de incubación de 4 h a 35 °C. Después de la misma se procede a la lectura manual de las reacciones de las microcúpulas de la 1 a la 9. La formación de β -naftilamidas se detecta en las microcúpulas que van desde la 10 a la 20 después de añadirse un agota del reactivo cinnamaldehído. Un color positivo (rosa, rojo o púrpura) se lee después de pasado 3 min., de incubación. Los colores de las reacciones se interpretan siguiendo la guía indicadora de color proporcionada en el suplemento. Los valores numéricos

asignados a cada microcúpula se calculan y se genera un código de siete dígitos. Las identificaciones de las levaduras se realizan refiriéndose al índice incluido en el manual (Land y cols., 1979; Land y Salkin, 1987; Salkin y cols., 1987; Pfaller y cols., 1988; Land y cols., 1991).

I.7.5.c.- RapID Yeast Plus System®.

El RapID Yeast Plus System ® (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Ga., USA) es un micrométodo cualitativo que se basa en reacciones enzimáticas de los sustratos cromogénicos y permite la diferenciación de las levaduras, hongos levaduras y organismos relacionados aislados de muestras clínicas humanas después de sólo 4 horas de incubación. En la lectura se obtiene un código de 6 dígitos y se comparan con el listado proporcionado por el fabricante (Marler y Eriquez, 1995; Kitch y cols., 1996; Buchaille y cols., 1998; Espinel-Ingroff y cols., 1998; Heelan y cols., 1998; Moghaddas y cols., 1999; Smith y cols., 1999; Verweij y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999; Innovative Diagnostic Systems, Catalog #1-1007).

Las pruebas usadas en el RapID Yeast Plus System están basadas en la degradación microbiana de los sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. Las reacciones empleadas son una combinación de ensayos tradicionales y pruebas de un solo sustrato cromogénico (Catalog #1-1007).

El RapID Yeast Plus System consiste en 18 sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de levaduras como son 5 carbohidratos, éster de ácido graso, 8 sustratos nitrofenilos, urea, 3 aminoácidos β -naftilamidas (Bobey y cols., 1980; Bobey y Ederer, 1981; David y Jahan, 1977; Kitch y Appelbaum, 1995; Marler y Eriquez, 1995; Perry y cols., 1990; Roberts y cols., 1978; Smith y cols., 1973; Warren y Shadomy, 1991; Watson, 1976).

I.7.5.d- MicroScan Rapid Yeast Identification®.

El MicroScan® (Baxter Healthcare Corporation, West Sacramento, Calif., USA) es un sistema enzimático automatizado de identificación de levaduras aisladas en muestras clínicas. Este sistema tasa actividades enzimáticas más que de crecimiento, usando en su mayor parte sustratos cromogénicos e identificando las levaduras en un período de 4 horas (Land y cols., 1991; St-Germain y Beauchesne, 1991; Riddle D y cols., 1994).

Las pruebas cromogénicas rápidas están basadas en la presencia de enzimas preformadas en el organismo desconocido (Bobey y Ederer, 1981; Lee y cols., 1975; Watson, 1976). De este modo el medio en el que ha crecido el organismo influirá en los resultados de la prueba debido a la inducción de diferentes enzimas por diferentes medios.

El MicroScan consta de una placa de 96 pocillos de microdilución con 27 sustratos deshidratados, conteniendo 13 aminoácidos β -naftilamidas; 3 carbohidratos; 9 sustratos nitrofenilos; 3-indoxil fosfato y urea (St-Germain y Beauchesne, 1991). Además, el panel incluye dos pocillos control para ayudar a interpretar las reacciones: control β -naftilamida (BNAC), y control nitrofenilo (NPC). Las reacciones bioquímicas son empleadas en crear perfiles numéricos que son comparados con una base de datos numérica de identificación de organismos (Land y cols., 1991; St-Germain y Beauchesne, 1991; Riddle D y cols., 1994). Los resultados se convierten a un número de nueve dígitos y se comparan con los códigos de la base de datos. O, en su caso, se realiza la interpretación automática en el AutoScan-4. Las identificaciones se consideran correctas cuando la probabilidad para una especie es superior o igual a 85 %.

El fundamento de las reacciones de identificación para los sustratos aminoácido-naftilamida se caracteriza porque cuando el enzima, generalmente, un aminoácido arilamidasa, correspondiente hidroliza al sustrato, se libera β -naftilamina. Esta se detecta añadiendo p -dimetilamino-cinamaldehído (en el reactivo peptidasa) que produce un complejo que es de color rosa-púrpura (Dade Behring,

1998). En el caso de los carbohidratos, la utilización de la sacarosa o trehalosa produce un descenso en el pH. El indicador rojo clorofenol cambia de púrpura a amarillo. Estas reacciones de carbohidratos son selectivas y pueden no ajustarse a las reacciones convencionales (Dade Behring, 1998).

Si el enzima correspondiente está presente, el sustrato nitrofenilo es roto liberando o-p-nitrofenol. A pH alcalino, estos compuestos son amarillos. Si la reacción tiene lugar en medio ácido, debe añadirse NaOH después de la incubación para poder leer los resultados. Los pocillos pueden ser transparentes o amarillo pálido antes de añadir el NaOH (Dade Behring, 1998).

El indoxil fosfato es escindido mediante una fosfatasa para liberar indoxilo. Esto se combina con el oxígeno para formar azul índigo que es un precipitado insoluble azul o azul gris. La ureasa escinde la urea formando amoníaco y CO₂. El amoníaco, en forma de carbonato amónico, produce un aumento del pH que se detecta por el rojo fenol que vira amarillo a rojo (Dade Behring, 1998).

I.7.6.- IDENTIFICACIÓN CROMOGÉNICA.

Los medios cromogénicos deben cumplir dos importantes requisitos como son facilitar la diferenciación de especies obtenidos a partir de mezclas de cultivos y permitir la directa y rápida identificación de las levaduras, especialmente aquellas resistentes a agentes antifúngicos (Baumgartner y cols., 1996).

I.7.6.a.- Albicans ID2®.

Albicans ID2® (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) es un medio selectivo de aislamiento que soporta el crecimiento de todas las especies de levadura, incluidas las del *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae*, etc. Contiene un sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosaminida) que es específico para una hexosamidasa que permite la identificación rápida y específica de las colonias de *C. albicans* sobre la base de su color azul (Contreras y cols., 1996). Durante la incubación, la hidrólisis del sustrato provoca la generación de un producto azul visible a simple vista. El producto no se difunde significativamente en el soporte del agar y, en consecuencia, pueden distinguirse colonias individuales de *C. albicans* (colonias azules), incluso en aislados que contienen más de una levadura (bioMérieux, 1997). La inclusión de gentamicina (0,1 g/l) y cloranfenicol (0,05 g) inhibe el crecimiento de la mayoría de contaminantes bacterianos (Fruit y cols., 1993; Rousselle y cols., 1994).

I.7.6.b.- Albicans ID®.

Albicans ID® (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) es un medio comercializado compuesto por biotina, 2 g; extracto de levadura, 6 g; hidrógenofosfato de sodio, 0,5 g; sustrato cromogénico (hexosamina), 0,05 g; ácido N-2-acetamidoimino-diacético sal de monosodio, 0,5 g; sulfato de gentamicina, 0,1 g; cloranfenicol, 0,05 g; agar, 14 g; agua destilada, 1 lt; pH 6,6. Después de la hidrólisis por la correspondiente enzima, permite la identificación específica de las colonias de *C. albicans* en la base de su color azul y apariencia lisa, pasadas las 24 h de incubación a 30°C. (Manafi y Willinger, 1991; Fruit y cols., 1993; Lipperheide y

cols., 1993; Waller y cols., 1993; Rousselle y cols., 1994; Willinger y cols., 1994; De Champs y cols., 1995; Baumgartner y cols., 1996; Contreras y cols., 1996; Hoppe y Frey, 1999).

I.7.6.c.- Candiselect®.

Candiselect® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia) es un medio de cultivo diferencial que facilita la presuntiva identificación de *C. albicans*. Su acción selectiva se basa en la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico por la enzima N-acetil- β -D-galactosaminidasa. Esta hidrólisis se aprecia con una coloración azul de las colonias de *C. albicans*. El color de las otras especies de levaduras permanece sin cambios (Campbell y cols., 1999). Permite una identificación rápida y específica de *C. albicans* en un cultivo primario y la detección de colonias con mezclas multi-microbianas. Contiene una base nutritiva con peptonas de soja, glucosa, que permite el crecimiento de levaduras; un sustrato cromogénico, N-acetil- β -D-galactosaminida, para la detección de la actividad enzimática, N-acetil- β -D-galactosaminidasa de *C. albicans* y los antibióticos cloranfenicol y gentamicina, responsables de la inhibición de bacterias (Campbell y cols., 1998; Freydière y cols., 1997; Hoppe y Frey, 1999; Sanofi Pasteur).

I.7.6.d.- CHROMalbicans Agar®.

El CHROMalbicans® (Biolife®, Milano, Italia) es un medio selectivo, debido a la presencia de cloranfenicol y gentamicina, y cromogénico específico para el aislamiento de levaduras y la inmediata identificación de *C. albicans*. La presencia de sustrato cromogénico en el medio permite evidenciar la actividad enzimática de *C. albicans*. De esta manera, el crecimiento de *C. albicans* se visualiza por la aparición de colonias de color azul o azul verdoso después de la incubación a 37 °C durante 24 a 48 h. Otras especies del género *Candida* crecen con colonias de color blanco.

I.7.6.e.- CHROMagar Candida®.

Odds y Bernaerts, 1994, informaron de un medio diferencial y selectivo que permite la identificación directa de levaduras de muestras clínicas, CHROMagar *Candida*® (CHROMagar company, París, Francia), medio de cultivo que facilita el aislamiento y la identificación presuntiva de algunas especies clínicamente importantes, como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, además de la diferenciación de poblaciones de levaduras por la morfología por el contraste de los colores de las colonias producido por la reacción de enzimas específicas de distintas especies con un sustrato cromogénico. Este medio facilita el reconocimiento de mezclas de cultivos de levaduras, de tal forma que, después de la hidrólisis por la correspondiente enzima, permite la identificación específica de las colonias de *C. albicans* por su color verde; las colonias de *C. tropicalis* por su color azul rodeado por un halo de color rosa y las colonias de *C. krusei* por color rosa y apariencia blanda (Odds y Bernaerts, 1994; Doleans, 1994; Freydière y Gille, 1994; Beighton y cols., 1995; Louwagie y cols., 1995; Anson y Allen, 1997; Bernal y cols., 1996; Baumgartner y cols., 1996; Bouchara y cols., 1996; Freydière, 1996; Pfaller y cols., 1996; San Millán y cols., 1996; Casal y cols., 1997; Houang y cols., 1997; Freydière y cols., 1997; García-Martos y cols., 1997; Ainscough y Kibbler, 1998; García-Martos y cols., 1998; Giusiano y Mangiaterra, 1998; Merlino y cols., 1998; Powell y cols., 1998; Hoppe y Frey, 1999; Koehler y cols., 1999; Willinger y Manafi, 1999).

I.7.7.- IDENTIFICACIÓN FLUOROGÉNICA.

I.7.7.a.- Fluoroplate *Candida*®.

Fluoroplate *Candida* ® (Merck®, Damstadt, República Federal de Alemania) es un medio diferencial comercializado para la rápida identificación de *C. albicans*. Las placas de agar Fluoroplate *Candida*® contienen N-acetil-β-D-galactosaminida, sustrato fluorogénico que, cuando es hidrolizado por la galactosaminidasa (NAGasa), permite la identificación de las colonias de *C. albicans* a partir de su fluorescencia blanquecina (por la liberación de 4-metilumbeliferona, sustancia fluorescente) emitida al iluminarse con luz ultravioleta de 365 nm (Quindós y cols., 1996). Pero el producto fluorescente hidrolizado debe difundir en el agar después de 24 h de incubación. Las colonias de otras especies de *Candida* aparecen en las mismas condiciones de color blanco no fluorescente que se distinguen fácilmente (Manafi y cols., 1991; Rousselle y cols., 1994; Freydière y cols., 1997; Hoppe y Frey, 1999).

I.7.7.b.- SDCA-MUAG® Agar.

El SDCA-MUAG® Agar (Biolife®, Italia) usa como sustrato fluorogénico el 4-metilumbeliferil N-acetil-β-D-galactosaminida, encargado de la determinación rápida de *C. albicans*. Se suspende colonias de levaduras cultivadas en AS con cloranfenicol, produciéndose la hidrólisis de la enzima β-D-galactosaminidasa de *C. albicans* con la liberación de 4-metilumbeliferona. Se incuba a 37°C durante 24-48 horas y luego su lectura requiere luz ultravioleta (Perry y Miller, 1987; Molina y Pizzocaro, 1989).

I.7.8.- TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

Los métodos inmunológicos son considerados importantes porque primeramente la mayoría de los hongos responsables de las infecciones sistémicas crecen lentamente.

La inmunología es la especialidad de la Micología que ha sufrido probablemente el crecimiento más rápido. El interés en la detección de la micosis por sus antígenos y anticuerpos ha existido durante mucho tiempo pero, hasta recientemente, la tecnología no era lo suficiente sofisticada para permitir una separación y purificación adecuada de los antígenos fúngicos. Un problema es que los hongos generalmente no son buenos antígenos. Otro es que en muchas micosis los hongos son secuestrados en un área del cuerpo y no tienen contacto íntimo con el sistema inmune del paciente. En diferencia con la bacteria, los hongos no tienen armas que le permitan entrar en tejidos sanos. Un tercer problema, en términos de desarrollo de pruebas de diagnóstico, es que la inmunidad celular más que la humoral tiene el importante papel de proteger al hospedador frente a los hongos. Finalmente, las reacciones cruzadas ocurren entre hongos relacionados antigénicamente y, a veces, entre hongos que no se conocen que estén relacionados. Las sustancias no específicas en sueros de paciente, tal como la proteína reactiva C, causan resultados falsos positivos en ciertas pruebas (Fisher y Cook, 1998).

I.7.8.a.- Reacción de precipitación.

Se produce al mezclar un antígeno soluble con el anticuerpo específico correspondiente. Los antígenos son precipitógenos y corresponde a ellos cualquier sustancia antigénica en suspensión coloidal, como proteínas séricas, toxinas, haptenos, etc. Los anticuerpos se denominan precipitinas (Carmona y cols., 1997).

La reacción de precipitina se encuentra en sistemas de pruebas que permiten la difusión libre de antígeno y anticuerpo enfrentados uno con el otro. En el punto crítico de interfase, donde las concentraciones son óptimas, se forma un precipitado visible compuesto por combinaciones de antígeno y anticuerpo. En un sistema de

difusión simple, el anticuerpo se incorpora en el agar donde se permite la difusión del antígeno. En un método en tubo, el antígeno se coloca sobre un agar que contiene el antisuero y en la zona de equivalencia se forman una o más líneas de precipitina (Koneman y cols., 1999).

I.7.8.b.- Técnicas basadas en reacciones de aglutinación.

Las reacciones de aglutinación pueden ser definidas como la agregación específica inmunoquímica de partículas (partículas sintéticas de látex) recubiertas con el antígeno o el anticuerpo que pueden ser usadas para detectar tanto anticuerpos como antígenos solubles, respectivamente. Los antígenos o los anticuerpos se fijan a la superficie de la partícula mediante fuerzas eléctricas intramoleculares o por uniones covalentes. La aglutinación de las partículas soporte ocurre como un indicador de las interacciones antígeno-anticuerpo sobre la superficie de estos soportes (Koneman y cols., 1999).

Entre las técnicas basadas en las reacciones de aglutinación cabe destacar:

- *Krusei color*®.

Krusei color® (Fumouze Diagnostics®, Francia) es un método fácil y rápido de usar para identificar las colonias de *Candida krusei* directamente de los diferentes cultivos. El reactivo *Krusei color*® está hecho de partículas de látex de color rojo recubierto con un anticuerpo monoclonal, anticuerpo del clon 6B3 (desarrollado por S R 2 B, Avrillé, Francia), que reacciona específicamente con un antígeno de *C. krusei* localizado en la superficie de la célula. Cuando las colonias de *C. krusei* se disocian con el reactivo *Krusei color*® se produce una aglutinación roja y si la levadura no es *C. krusei* el reactivo mantiene su apariencia original (Bignardi y cols., 1991; Carlotti y cols., 1994; Robert y cols., 1994; Samaranayake y Samaranayake, 1994; Samaranayake y cols., 1994; Iween y cols., 1995; Freydière y cols., 1997; Laboratorios Fumouze, 1995).

- Bichrolatex *Albicans*®.

Bichrolatex *Albicans*® (Fumouze Diagnostics®, Levallois-Perret, Francia) presenta dos reactivos diferentes: un agente disociante conteniendo enzimas y un reactivo látex marrón. Es un método rápido de identificación *C. albicans* (Dromer y cols., 1996; Laurent y cols., 1996; Robert y cols., 1994). Las partículas de látex están cubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con un antígeno de *C. albicans* principalmente localizado en la pared celular. Son partículas rojas en una suspensión de un tinte verde y una reacción positiva se traduce como aglutinamientos rojos en un fondo verde. La no presencia de aglutinamientos o la presencia de blancos o rojos agregados sin fondo verde es considerada como negativo. Bichrolatex *Albicans* puede ser de especial interés en casos de fungemia para identificar *C. albicans* de hemocultivos rápidamente sin la necesidad de cultivar en medio de agar (Freydière y cols., 1997; Robert y cols., 1994; Laurent y cols., 1996; Quindós y cols., 1997; Cahen y cols., 1999).

- Método de serotipado.

Las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras son un criterio para determinar la especie, pero no el único. Pruebas serológicas, semejantes a las utilizadas para tipar a las bacterias según su estructura antigénica, han sido también aplicadas a la taxonomía de las levaduras patógenas y en ellas se basa otro método de identificación a nivel de especie (Gallach, 1989). Los primeros estudios indican una similitud considerable entre especies de *Candida*. Jonsen fue el primero en mostrar que la reactividad antigénica cruzada resultaba de las semejanzas a nivel de polisacáridos de superficie entre las especies de *Candida* (Jonsen, 1955).

Un grupo de Japón dirigido por Tsuchiya estudió algunas especies de *Candida* por pruebas de aglutinación cruzada. En el año 1961 se habían clasificado 22 especies del género *Candida* atendiendo a los complementos de los componentes antigénicos estables al calor y de los componentes antigénicos lábiles al calor (Tsuchiya y cols., 1961). Todas las especies del género *Candida* tienen un antígeno común y la mayoría tienen dos. Desde entonces, el trabajo de Tsuchiya ha sido

extensamente confirmado y ampliado, encontrándose disponible comercialmente una prueba de antisuero llamada "Tsuchiya-factor" para la identificación de levaduras (Shinoda y cols., 1981). Los posteriores estudios sobre reactividad antigénica cruzada entre especies patógenas de *Candida* mostraron similitudes antigénicas considerables entre *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* tienen comparativamente diferentes complementos de antígenos, de forma que, ocasionalmente, pueden aparecer reacciones cruzadas (Biguet y cols., 1961, 1965; Dastidar, 1968; Tsuchiya y cols., 1974; Héctor y cols., 1981; Gabriel-Bruneau y Guinet, 1984; Bruneau y cols., 1985).

Hasenclever y Mitchell (Hasenclever y Mitchell, 1961) fueron los primeros en demostrar que los aislamientos de *C. albicans* podían ser separados en dos serotipos, A y B, utilizando pruebas de aglutinación. Se emplean antisueros contra seis sueros de *C. albicans* inoculando una suspensión en conejos por vía intravenosa. Los sueros que aglutinen se denominan sueros del grupo A y los sueros que no aglutinan se les llama sueros del grupo B. De esta forma, Hasenclever y Mitchell evidencian la presencia de dos grupos antigénicos en *C. albicans*, los sueros del grupo A tienen uno o más antígenos que no están presentes en los sueros del grupo B. Esta separación en tipos de *C. albicans* se puede también conseguir por reacciones de precipitina (Stallybrass, 1964; Sweet y Kaufman, 1970) y por inmunofluorescencia, aunque es posible que *C. albicans* tipo B pueda expresar antígenos tipo A "in vitro" o "in vivo" (Poulain y cols., 1983). Müller y Kirchhoff (Müller y Kirchhoff, 1969) introdujeron un serotipo C de *C. albicans* por unos aislamientos extraños que no reaccionaban claramente ni como tipo A ni como tipo B; estos aislamientos serían mejor descritos como no tipables (Odds, 1988).

El sistema de serotipado "*Candida* Check" (Iatron Laboratories, Inc. Tokyo, Japón) es un sistema comercializado de identificación de levaduras, basado en las diferencias antigénicas entre las especies. Esta técnica de serotipado consta de 10 antisueros específicos contra antígenos de superficie de la pared celular de *Candida*. Estos antisueros se obtienen de fracciones tipo IgG de suero de conejo según el método descrito por Fukazawa y colaboradores (Fukazawa y cols., 1968). Permite

identificar 8 especies patógenas de *Candida* además de distinguir el serotipo A y B de *C. albicans*.

I.7.8.c.- Inmunoensayos en fase sólida.

Se refieren a la unión tanto de antígeno como de anticuerpo a una variedad de materiales sólidos, como pocillos de poliestireno o cuentas de plástico (Koneman y cols., 1999). Entre otros métodos cabe destacar:

- Métodos radioinmunológicos (RIA).

Un antígeno marcado con un isótopo (ej., ^{125}I) y el mismo antígeno no marcado, compiten por fijarse a un anticuerpo específico. Como el antígeno marcado y el anticuerpo se encuentran en cantidades fijas, todo aumento del antígeno no marcado produce una disminución del marcado que se fija a los anticuerpos. La radiactividad final del complejo inmune es inversa a la cantidad de antígeno investigado (Carmona y cols., 1997). Las curvas se obtienen por determinación el grado de inhibición de la unión del anticuerpo marcado cuando es mezclado con diluciones seriadas de cantidades conocida de anticuerpo sin marcar (Koneman y cols., 1999).

- Métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

La técnica de ELISA, descrita por vez primera por Engvall y Perlman en 1971 (Engvall y Perlman, 1971), consiste en que una enzima es fijada sobre un anticuerpo. Si se utiliza luego el sustrato de la enzima, ésta da una reacción coloreada. La intensidad de la coloración permite la dosificación de un antígeno específico del anticuerpo, pues a mayor cantidad, mayor también la cantidad de anticuerpo marcado que será fijado (Carmona y cols., 1997).

I.7.8.d.- Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia brinda una alternativa como método para la detección y la localización de antígenos que permitan el diagnóstico de enfermedades bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales. Esta técnica también puede ser utilizada para detectar anticuerpos en diagnósticos retrospectivos de enfermedades infecciosas (Koneman y cols., 1999). La inmunofluorescencia consiste en unir a anticuerpos una sustancia fluorescente (isotiocianato de fluoresceína, rodamina, B. lisamina). Si éstos son retenidos por los antígenos específicos, los complejos inmunes formados se harán visibles por la fluorescencia emitida por el anticuerpo marcado, al ser excitado por la luz ultravioleta, sin alterar su reactividad inmunológica (Carmona y cols., 1997). El antisuero conjugado se adiciona a células o tejidos que se encuentran sobre un portaobjeto y se fija a los antígenos para formar un complejo inmune estable. Los materiales no reaccionantes se eliminan por lavado y luego el preparado se seca y se observa con un microscopio de fluorescencia (Koneman y cols., 1999; Mahony y Chernesky, 1999). Los antígenos unidos específicamente a un anticuerpo fluorescente pueden ser detectados como objetos brillantes de color verde manzana o amarillo naranja contra un fondo oscuro según el fluorocromo y los filtros que se utilicen (Koneman y cols., 1999). A veces resulta difícil la interpretación de los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia. La luz de excitación debe estar muy eficientemente filtrada de la luz fluorescente emitida, de modo que, en esencia, todo lo que vea el microscopista sea el anticuerpo fluorescente que recubre y delinea el microorganismo. El brillo de la imagen depende del número de sitios antigénicos disponibles, la calidad y concentración del anticuerpo marcado con fluorocromo, la intensidad de la luz de excitación de longitud de onda que llega hasta la muestra y la calidad del microscopio (Carmona y cols., 1997).

Los tipos de inmunofluorescencia a destacar son:

1. Directa. Se utiliza generalmente para la detección del antígeno (Koneman y cols., 1999). Se coloca un frotis del agente o célula patógena junto con anticuerpos conocidos marcados con fluorocromo. Este método permite identificar un agente en un producto patológico, aunque el producto esté contaminado por otros agentes.

Tiene aplicación en el diagnóstico de Estreptococos, Genococos, *B. pertussis* y Treponemas, entre otros. La especificidad de la prueba varía también por la oportunidad del muestreo y la facilidad para identificar el patógeno microbiano particular que se investiga (Carmona y cols., 1997).

2. Indirecta. Consiste en buscar en un suero un anticuerpo en presencia de un antígeno conocido. El complejo inmune se hace visible gracias a la adición de un suero antiglobulina específica de la especie, marcado con un colorante fluorescente (Carmona y cols., 1997).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) facilita el desarrollo de un método rápido para la identificación de *C. dubliniensis* en muestras clínicas, para lo cual es necesario conocer las diferencias antigénicas entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Un antisuero de un conejo policlonal anti-*C. dubliniensis* se emplea para identificar los antígenos específicos de la pared celular para *C. dubliniensis*. Se ha comprobado que la composición antigénica de *C. dubliniensis* es muy similar a la de *C. albicans*. Los sueros anti-*C. dubliniensis* se fabrican en los conejos por inoculación con estirpes muerta de formalina de *C. dubliniensis*. De cualquier forma, el uso del antisuero anti-*C. dubliniensis* absorbido con las blastoporas de *C. albicans*, técnica originalmente usada por Hasenclever y Mitchell (Hasenclever y Mitchell, 1961) para identificar la existencia de dos serotipos en *C. albicans*, permite una clara diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* por inmunofluorescencia indirecta (Bikandi y cols., 1998).

3. Anticomplemento. La fijación del complemento de cobaya por un complejo inmune es revelada por un suero anticomplemento de cobaya marcada con fluorocromo. Así se puede utilizar un solo suero fluorescente para estudiar múltiples sistemas inmunitarios (Carmona y cols., 1997).

4. Por competición. Un antígeno conocido reacciona con suero del paciente diluido. En un segundo tiempo se mete en la reacción un suero específico del antígeno marcado con fluorocromo. Si el suero del enfermo es positivo, saturará todos los sitios antigénicos y el segundo suero marcado no podrá fijarse, por tanto, el antígeno no aparece fluorescente. Si el suero del paciente es negativo, los antígenos

aparecerán fluorescentes, por el suero marcado de la segunda reacción (Carmona y cols., 1997).

I.7.9.- MÉTODOS MOLECULARES.

Los avances en la biología molecular en los últimos 10 años han abierto una nueva frontera para la identificación y caracterización genotípica de los microorganismos. Estos desarrollos están comenzando a afectar a muchas áreas del paciente (Persing, 1991; Tang y cols., 1997; Tang y Persing, 1999). La tecnología de amplificación del ácido nucleico ha abierto nuevos caminos para la detección, identificación y caracterización de organismos patógenos en el laboratorio de microbiología clínica (Eisenstein, 1990; Persing, 1991; White y cols., 1992; Wagar, 1996; Tang y cols., 1997). El crecimiento *in vitro* no es necesariamente el camino más largo para la identificación microbiana (Greer y cols., 1991; Miller y cols., 1994).

Las amplificaciones moleculares mejoran la rapidez, sensibilidad y, en ocasiones, la especificidad de un diagnóstico etiológico. Durante la última década, las ventajas de las técnicas de diagnóstico molecular han instalado en los laboratorios de microbiología clínica el uso de estas técnicas para la detección de algunos agentes infecciosos, especialmente aquellos para los cuales las pruebas comerciales son empleadas (Tang y Persing, 1999).

I.7.9.a.- Sondas de Ácidos Nucleicos.

En términos generales, una sonda de ácido nucleico es una secuencia de cadena simple de ácido nucleico que puede hibridar específicamente con su cadena complementaria mediante el apareamiento de bases. El principio básico de la tecnología de sondas de DNA es la hibridación, la cual involucra la desnaturalización del dsDNA en dos cadenas simples y la detección del ssDNA con una sonda de ssDNA marcada y complementaria (Koneman y cols., 1999). Las secuencias genómicas específicas para un grupo particular de agentes infecciosos son seleccionadas, clonadas, sintetizadas y usadas como sondas. Las sondas hibridan con dianas de DNA o RNA en la muestra clínica. Las sondas de los ácidos nucleicos pueden ligar con alta especificidad secuencias complementarias de un ácido nucleico diana y son capaces de identificar organismos por encima y por abajo del nivel de

especie. Las sondas marcadas con enzimas, mitades antigénicas o quimioluminiscentes, o radioisótopos son detectadas por sistemas automatizados prontamente. La sensibilidad del método varía directamente con el tamaño y composición de la sonda como con la naturaleza de la muestra original. La identificación de organismos en cultivos puros es, generalmente, es más correcta que la detección de organismos en muestras clínicas (Tang y Persing, 1999). Han sido descritas un número de sondas de DNA comercialmente preparadas para la identificación de agentes infecciosos (Drake y cols., 1987; Granato y Franz, 1990; Kiviat y cols., 1990; Hall y cols., 1992; Lewis y cols., 1993).

La hibridación con sondas puede ser utilizada para demostrar la relación genética en el DNA de diferentes microorganismos. En el laboratorio de diagnóstico, las sondas de DNA han sido empleadas para la confirmación de los resultados obtenidos por cultivo como una alternativa a los métodos convencionales, que requieren mucho tiempo o son muy laboriosos. También son utilizadas para la detección de microorganismos exigentes directamente en muestras clínicas (Koneman y cols., 1999).

I.7.9.b.- Amplificación de genes: PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica altamente sensible por medio de la cual secuencias de DNA o RNA que se encuentran en cantidades muy pequeñas se pueden amplificar enzimáticamente de un modo tal que es posible disponer de una cantidad de material suficiente para alcanzar una “señal” umbral detectable (Persing, 1991); se usa para amplificar la región diana: un espacio interno transcrito del DNA ribosomal (Irobi y cols., 1999). El ímpetu para el desarrollo de esta nueva tecnología surgió a partir de investigaciones básicas realizadas por Mullis, en 1985, y otros científicos que trabajaban en la Corporación Cetus en el Departamento de Genética Humana de Emerysville, California (Mullis y cols., 1987; Ehrlich y cols., 1988; Saiki y cols., 1988; Mullis, 1990). La técnica puede ser utilizada para detectar cantidades muy pequeñas de ácido nucleico específico en muestras clínicas, en las cuales se piensa que agentes bacterianos, viriales o fúngicos tienen un papel causal. La base fundamental de esta tecnología es

que cada agente infeccioso causante de una enfermedad posee una "secuencia característica propia" en su composición de DNA o RNA por medio de la cual puede ser identificado. La PCR es un método por el cual se realizan *in vitro* repetidos ciclos de síntesis, dirigida por oligonucleótidos, de estas secuencias propias de DNA (Koneman y cols., 1999).

En los laboratorios de investigación se desarrollan métodos moleculares para la detección directa de *C. albicans* en muestras clínicas, para estudios epidemiológicos y para el diagnóstico de la enfermedad invasora. Holmes y colaboradores (Holmes y cols., 1994) describieron una técnica de amplificación de PCR para la detección de *C. albicans* en muestras clínicas mediante cebadores complementarios para el rDNA 5S extraído y la región espaciadora no transcripta adyacente en el DNA cromosómico de la levadura.

La PCR se realiza con un "soporte caliente" automatizado y computarizado denominado ciclador térmico (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT). Los "ingredientes" necesarios para la reacción –el dsDNA de interés, los oligonucleótidos "iniciadores" de cadena simple, el desoxinucleótido trifosfato (marcado con ³²P) y la DNA polimerasa *Taq*- se disponen juntos en un pequeño vial, que a su vez se ubica en el soporte. El ciclador térmico es capaz de elevar, mantener y enfriar la temperatura de los viales de un modo que permite la desnaturalización inicial del DNA y que luego ocurran ciclos repetidos de síntesis y desnaturalización del DNA. El paso inicial de desnaturalización "funde" el dsDNA entre los 95 y los 100 °C. Los oligonucleótidos "iniciadores" de cadena simple que flanquean la secuencia de DNA de interés (la que necesita ser amplificada) se unen a los filamentos de DNA desnaturalizado durante un paso de enfriamiento. La extensión de los iniciadores por síntesis de DNA se realiza por una polimerasa *Taq* termoestable. La repetición secuencial de la desnaturalización por calor-unión del iniciador y de la reacción de extensión a partir del iniciador determina la amplificación de las secuencias de DNA localizadas entre los iniciadores (Koneman y cols., 1999).

La detección de los productos finales de una PCR suele realizarse por separación electroforética de los componentes de la muestra final amplificada en

geles de agarosa o poliacrilamida, seguida por una tinción del gel en la solución buffer de migración. La separación en el gel se puede visualizar en un transiluminador de radiación ultravioleta de corta longitud de onda, que compara las bandas separadas con aquellas obtenidas en una corrida estándar realizada en paralelo. Las secuencias blanco de DNA o RNA que han sido amplificadas también se pueden detectar más específicamente por hibridación del DNA amplificado con una sonda sintética marcada que asea complementaria a toda o a una parte de la secuencia amplificada del DNA (Koneman y cols., 1999).

I.7.9.c.- Amplificación basada sobre la transcripción.

Kwoh y colaboradores (Kwoh y cols., 1989) describieron en 1989 un método denominado amplificación basada sobre la transcripción, que ha sido llamado NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico) o 3SR (replicación autosustentable de secuencias). La técnica de 3SR tiene su máxima utilidad en la amplificación de ssRNA más que en la de DNA. En esta estrategia, se sintetiza en primer lugar el DNA complementario a una secuencia blanco de RNA; este DNA es luego utilizado como un templado para la transcripción. La técnica de 3SR usa tres enzimas en la mezcla de reacción: una transcriptasa inversa (TR, purificada del virus de la mieloblastosis aviaria), RNAasa H (de *E. coli*) y la RNA polimerasa DNA-dependiente del bacteriófago T7 (Koneman y cols., 1999).

I.7.9.d.- Amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA).

Esta técnica explota el hecho de que, luego de un corte en una de las cadenas de dsDNA por una endonucleasa de restricción específica de sitio, la DNA polimerasa puede unirse y sintetizar una copia complementaria del ssDNA; la cadena cortada es desplazada por la cadena que se copia durante el proceso de síntesis de DNA. La incorporación de nucleótidos α -tio sustituidos en la mezcla de reacción vuelve a las cadenas recién sintetizadas resistentes a los cortes por endonucleasas de restricción. Moléculas de DNA cadena doble que poseen una cadena α -tio sustituida sólo pueden ser cortadas por enzimas de restricción en la “cadena nativa”, de modo que el ssDNA que es desplazado durante el proceso de copia puede actuar luego

como molde para la unión de un iniciador y la extensión de cadenas de nucleótidos. El corte de una cadena simple y la polimerización siguiente y el desplazamiento de la cadena siguen ocurriendo debido a la regeneración continua de sitios de corte inalterados en las moléculas dúplex (Koneman y cols., 1999).

I.7.9.e.- Reacción en cadena de la ligasa o LCR.

Esta técnica de amplificación de la sonda descrita por vez primera en 1989 por Wu y Wallace (Wu y Wallace, 1989), se caracteriza por que el blanco de DNA cadena simple se incuba con sondas de oligonucleótidos que se unen extremo a extremo al blanco. Luego, una DNA ligasa termoestable “liga” o une entre sí a las dos sondas (Barany, 1991). El dúplex resultante se calienta y causa la desnaturalización y la separación del ssDNA blanco y las sondas ligadas. Las sondas ligadas y el blanco se unen nuevamente a secuencias sonda extremo a extremo, seguido por un ligado para la formación de otro dúplex. Estos pasos se repiten muchas veces. La acumulación geométrica de los productos del ligamiento genera la amplificación de la sonda. La unión de grupos funcionales (biotina, enzimas) a las sondas determina el marcado de los productos ligados a la sonda, lo cual permite detectarlos (Koneman y cols., 1999).

I.7.10.- TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO.

I.7.10.a.- Microring YT®.

El Microring YT® (Medical Wire and Equipment Co Ltd. Corsham, Reino Unido) es un sistema comercial para la rápida identificación de aislamientos de levaduras clínicas, en un período de 24 a 48 h. Se trata de un sistema basado en la inhibición selectiva del crecimiento fúngico por colorantes y otros reactivos químicos, como: verde janus, bromuro de etidio, clorhidrato de trifetil tetrazolio, verde brillante, cicloheximida y rodamina 6G, que impregnan una serie de discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro. El patrón de crecimiento y de inhibición producidos proporciona un código de seis dígitos que puede ser comparado con una tabla que suministra el fabricante (Ridgway y Allen, 1991; McGowan y Mortensen, 1993; Torres-Rodríguez y cols., 1994).

II.- MATERIAL Y MÉTODOS.-

II.1.- PROCEDENCIA DE LAS LEVADURAS.

De las 537 levaduras ensayadas en el estudio, 484 (90,13 %) procedían en su mayor parte de muestras clínicas de distintas localizaciones orgánicas remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) (HUC). Se utilizaron muestras obtenidas de pacientes atendidos en consultas externas así como en diferentes áreas de hospitalización, durante el período comprendido entre los años 1997 a 1999. Las 53 (9,87 %) levaduras restantes fueron remitidas a nuestro Servicio desde otros hospitales con el fin de completar el espectro de las principales especies del género *Candida* de mayor relevancia clínica.

Así mismo se ensayaron cepas de referencia procedentes de colecciones internacionales “American Type Culture Collection” (ATCC).

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

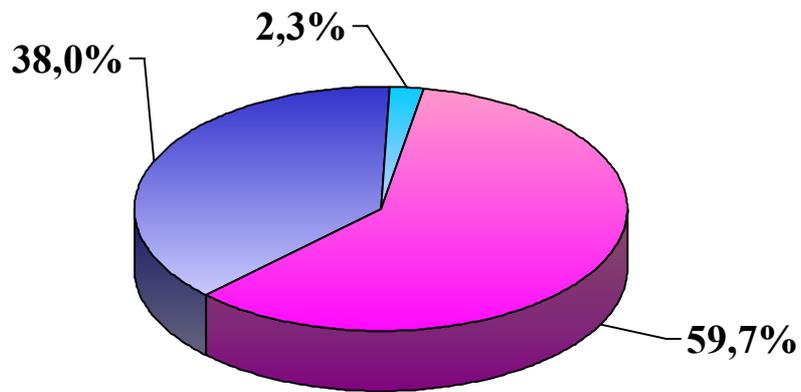
II.2.- LEVADURAS AISLADAS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS.

Del total de 461 muestras, se obtuvieron 484 aislados distintos debido a la aparición de 22 cultivos mixtos, a partir de los que se pudieron aislar dos o más especies. El 59,7 % de las muestras correspondieron a mujeres y el 38 % restante a varones, no existiendo información para el 2,3 % por no ser remitidos los datos del paciente desde el Servicio de origen. En la tabla XIII y figura 1 se presentan los resultados globales, expresados en números absolutos y correspondiente porcentaje.

Tabla XIII. Distribución según sexo.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Mujer	289	59,7
Varón	184	38
Desconocido	11	2,3
<u>Total</u>	484	100

FIGURA 1
DISTRIBUCIÓN DE LEVADURAS SEGÚN SEXO.



II.2.1.- FRECUENCIA DE LOS AISLADOS EN CULTIVOS MIXTOS.

En las tablas XIV y XV quedan reflejados, respectivamente, los Servicios de los que procedían los cultivos mixtos así como su procedencia. En este sentido, se observa que fue el Servicio de Dermatología (45,5 %) el que remitió un mayor número de muestras de este tipo. A éste, le siguieron el de Ginecología (22,7 %), Hematología, Neumología y U.V.I con el 9,1 % y Cirugía general con el 4,5 %.

De los 22 cultivos mixtos, y según el tipo de muestra, un 40,9 % correspondió a uñas; el 27,3 % a muestras vaginales; el 9,1 % a muestras respiratorias y un 4,5 % a otras muestras (catéter, coprocultivo, exudado orofaríngeo, orina y piel).

Tabla XIV. Distribución por Servicios de los cultivos mixtos.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Dermatología	10	45,5
Ginecología	5	22,7
Hematología	2	9,1
Neumología	2	9,1
U.V.I.	2	9,1
Cirugía General	1	4,5
<u>Total</u>	22	100

U.V.I. Unidad de vigilancia intensiva.

Tabla XV. Distribución según procedencia orgánica de los cultivos mixtos.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Uñas	9	40,9
Vaginal	6	27,3
Muestras respiratorias	2	9,1
Catéter	1	4,5
Coprocultivo	1	4,5
Exudado orofaríngeo	1	4,5
Orina	1	4,5
Piel	1	4,5
Total	22	100

II.2.2.- DISTRIBUCIÓN DE AISLADOS SEGÚN EL SERVICIO.

En la tabla XVI se muestran las levaduras aisladas, expresadas en número y porcentaje según el Servicio de origen de las diferentes muestras correspondientes al HUC. Ginecología fue el Servicio que remitió un mayor número de muestras (21,1 %), siguiéndole el de Dermatología (17,8 %), U.V.I. (12,6 %); Medicina Interna (9,5 %); Hematología (8,1 %); Cirugía general (5,6%). El resto de las levaduras procedió de otros servicios con una proporción inferior a 5 %, siendo el de Cirugía Vascular y Reumatología los servicios que menor número de muestras remitieron al laboratorio para su posterior procesamiento (Figura 2 y figura 3). Se desconoce el Servicio de origen en un 3,7 % de los aislados obtenidos, por no remitirse los datos completos requeridos para el estudio adjunto a la muestra recibida.

Tabla XVI. Distribución y frecuencia de las cepas aisladas según el servicio.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Ginecología	100	21,1
Dermatología	86	17,8
U.V.I.	61	12,6
Medicina Interna	46	9,5
Hematología	39	8,1
Cirugía general	27	5,6
Nefrología	22	4,5
Neonatología	17	3,5
U.C.S.I.	13	2,7
Neumología	7	1,4
Neurocirugía	6	1,2
Pediatría	6	1,2
Oncología	5	1
COT	4	0,8
Radioterapia	4	0,8
U.C.I.	4	0,8
Digestivo	3	0,6
Laboratorio Bacteriología	3	0,6
Urología	3	0,6
Cirugía plástica	2	0,4
Neumología infantil	2	0,4
ORL	2	0,4
UCI-pediátrico	2	0,4
Cirugía vascular	1	0,2
Reumatología	1	0,2
Desconocido	18	3,3
<u>Total</u>	484	100

COT., Cirugía Ortopédica y Traumatología; U.C.I., Unidad Coronaria Intensiva; U.C.S.I., Unidad de Cuidados Semi Intensivos; U.V.I., Unidad de Vigilancia Intensiva

FIGURA 2
SERVICIOS DE ORIGEN DEL H.U.C.

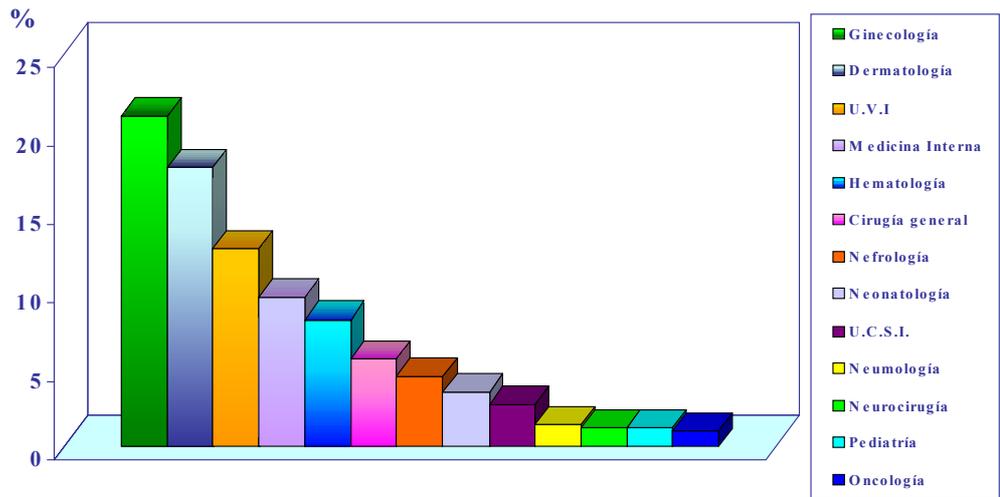
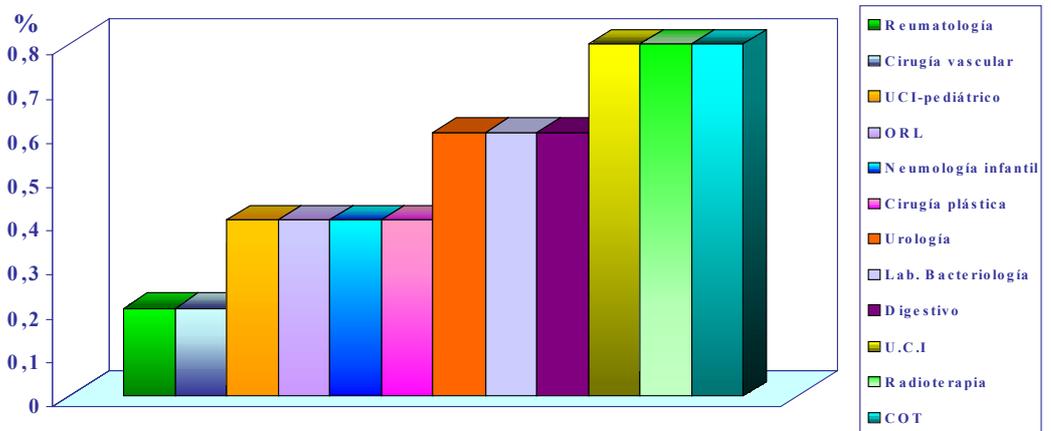


FIGURA 3
OTROS SERVICIOS DE ORIGEN DEL H.U.C.



II.2.3.- DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE AISLADOS SEGÚN SU PROCEDENCIA ORGÁNICA.

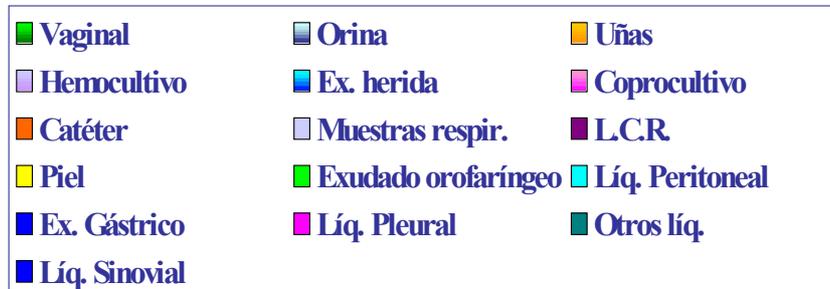
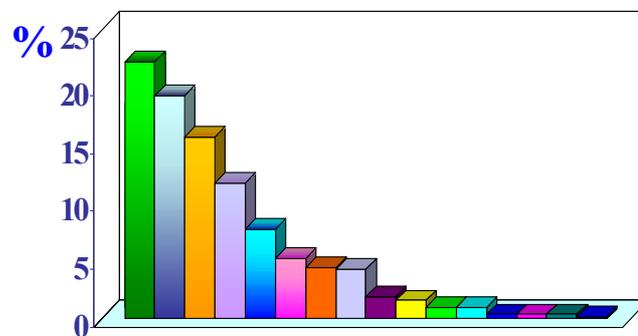
En la tabla XVII figuran los valores absolutos y porcentuales de los aislados según la procedencia orgánica de las muestras remitidas. El porcentaje más elevado de muestras clínicas procesadas correspondió a las de procedencia vaginal (22,3 %), seguidas de los urinocultivos (19,4 %), uñas (15,7 %), hemocultivo (11,8 %), exudado de herida (7,8 %), coprocultivo (5,2 %), catéteres (4,5 %) y muestras respiratorias (4,3 %). Nos encontramos ante porcentajes inferiores al 4,5 % y, por lo tanto, más reducidos, de muestras de líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) (1,9 %), piel (1,6 %), exudado orofaríngeo (1%) y líquido peritoneal (1 %). El resto se presentaron en una frecuencia inferior al 0,5 % (Figura 4). En el 1,9 % de las muestras se desconocía su procedencia orgánica.

Tabla XVII. Distribución de las muestras clínicas según la procedencia orgánica.

Tipo de muestra	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Vaginal	108	22,3
Orina	94	19,4
Uñas	76	15,7
Hemocultivo	57	11,8
Exudado herida	38	7,8
Coprocultivo	25	5,2
Catéter	22	4,5
Muestras respiratorias	21	4,3
L.C.R.	9	1,9
Piel	8	1,6
Exudado orofaríngeo	5	1
Líquido peritoneal	5	1
Exudado gástrico	2	0,4
Líquido pleural	2	0,4
Otros líquidos corporales	2	0,4
Líquido sinovial	1	0,2
Desconocido	9	1,9
Total	484	100

L.C.R., Líquido Cefalorraquídeo

FIGURA 4
MUESTRAS CLÍNICAS SEGÚN LA PROCEDENCIA ORGÁNICA.



II.2.4.- OTRAS CEPAS ENSAYADAS EN EL ESTUDIO: *C. DUBLINIENSIS* Y *C. LUSITANIAE*.

Un total de 53 cepas de *C. dubliniensis* (n=38) y *C. lusitaniae* (n=15) fueron cedidas por otros hospitales, con el fin de poder ampliar el espectro de las especies del género *Candida* y completarlos con patógenos emergentes y especies de nueva descripción (*C. dubliniensis*) no aisladas en nuestro medio hospitalario hasta ahora, o bien, aisladas e una reducida proporción como es el caso de *C. lusitaniae*. En la tabla XVIII se recoge el origen geográfico de los hospitales que cedieron las cepas de *C. dubliniensis* para ser incluidas en este estudio. La procedencia geográfica de las mismas correspondió a Bilbao (60,5 %), repartiéndose el resto entre Dublín (18,4 %), Granada (8 %), Santander (5,3 %), Barcelona, Brasil e Italia (2,6 %). Por otro lado, todas las cepas de *C. lusitaniae* (n=15) procedían de Bilbao (figura 5).

Asimismo, se desconoce (28,3 %) la procedencia orgánica de las muestras de *C. lusitaniae*, mientras que las de *C. dubliniensis* se distribuyen entre el 45,3 % de muestras respiratorias, 22,6 % de muestras vaginales y 3,8 % de exudado orofaríngeo. Tabla XIX y figura 6.

Tabla XVIII. Procedencia de las cepas de *C. dubliniensis*.

Procedencia	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Bilbao	23	60,5
Dublín	7	18,4
Granada	3	8
Santander	2	5,3
Barcelona	1	2,6
Brasil	1	2,6
Italia	1	2,6
<u>Total</u>	38	100

Tabla XIX. Procedencia orgánica.

Origen	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Muestras respiratorias	24	45,3
Vaginal	12	22,6
Exudado orofaríngeo	2	3,8
Desconocido	15	28,3
<u>Total</u>	53	100

FIGURA 5
PROCEDENCIA DE LAS CEPAS
DE *C. DUBLINIENSIS*

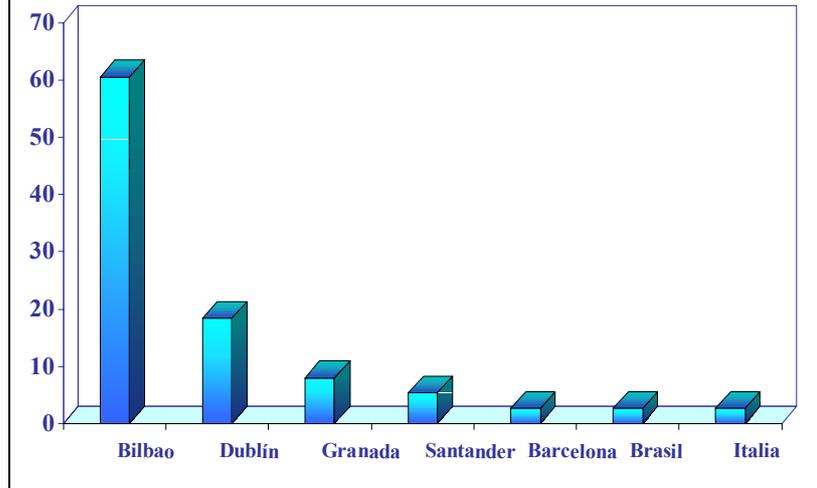
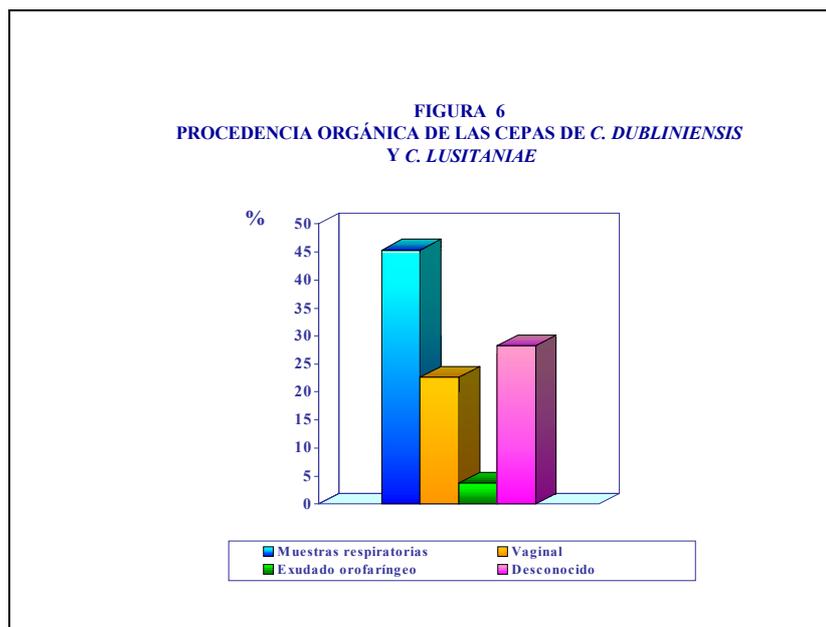


FIGURA 6
PROCEDENCIA ORGÁNICA DE LAS CEPAS DE *C. DUBLINIENSIS*
Y *C. LUSITANIAE*



II.2.5.- CEPAS DE REFERENCIA ENSAYADAS.

Se han utilizado 11 cepas de referencia procedentes de colecciones internacionales de cultivos tipo, de la “American Type Culture Collection” (ATCC), para establecer la reproducibilidad de los métodos de identificación incluidos en este trabajo (Tabla XX). Se han realizado identificaciones de estas cepas tres veces durante tres días diferentes por las diferentes técnicas utilizadas.

Tabla XX. Cepas de referencia utilizadas en el ensayo.

Referencia	Identificación
ATCC 200950	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 200952	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 200953	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 20959	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 42720	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 64125	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 66035	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 90028	<i>Candida albicans</i>
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 90018	<i>Candida parapsilosis</i>

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

II.3.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS.

Las muestras clínicas remitidas al servicio de Microbiología fueron procesadas por el personal del mismo siguiendo los protocolos estándar de trabajo establecidos por el propio servicio. Las muestras que, a partir de los cultivos en medios de Sabouraud, Agar-Sangre o Agar-Corazón-Cerebro, se identificaron por medio de la tinción de Gram, como formas levaduriformes, nos son remitidas, iniciando nosotros a partir de los cultivos la identificación de las levaduras.

II.4.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*.

II.4.1.- MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS.

a) Medio sólido de SABOURAUD con antibiótico

Es un medio de aislamiento no selectivo utilizado en Micología compuesto por glucosa, 20 g; peptona, 10 g; agar, 15 g; cloranfenicol, 0,5 g; agua destilada, 1l. Para su preparación se prepara la disolución hasta la fusión del agar completándose el volumen de agua hasta 1l. y se deja reposar durante varios minutos, antes de esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min (Arévalo, 1989).

b) Medio de SABOURAUD líquido ácido

Medio de características reseñadas anteriormente (glucosa; 20 g., peptona; 10 g., agua destilada 1l) que se prepara de forma similar para posteriormente repartir en 4 tubos de 10 ml añadiendo de 1 a 4 gotas de HCL 1,0 N, para obtener un gradiente de pH ácido (Haley 1971; Haley, 1978; Larone, 1995; Fisher y Cook, 1998).

II.4.2.- DENSITÓMETRO EMPLEADO.

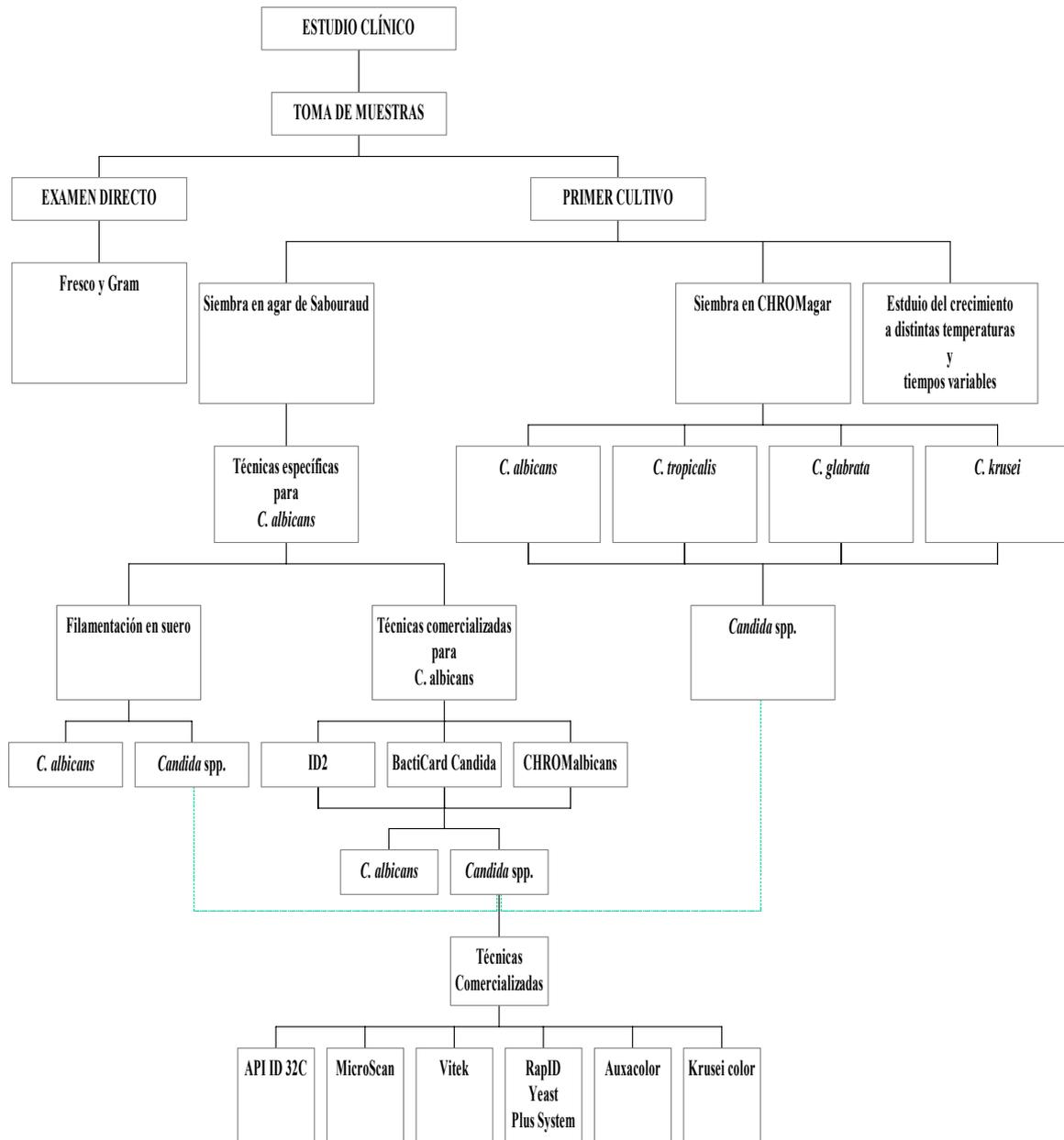
Las medidas de turbidez para la preparación de los distintos inóculos se realizaron por medio de un densitómetro Densimat® (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francia).

II.4.3.- PROTOCOLO SEGUIDO EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *CANDIDA*.

Efectuado el aislamiento primario de la levadura, se practicaron métodos rápidos, como el test de filamentación en suero, para poner de manifiesto propiedades específicas de *Candida albicans*, al igual que resiembró en el medio de cultivo de CHROMagar *Candida*® para comprobar la existencia de posibles mezclas de levaduras. A continuación, se utilizaron las distintas técnicas comercializadas para corroborar o no la identificación y para determinar la identificación hasta nivel de especie en el caso de resultar negativo el test de filamentación.

En el esquema 1 se ofrece de forma esquematizada la sistemática de trabajo seguida para la identificación de las levaduras procedentes de las muestras clínicas en nuestro estudio.

Esquema 1.- Sistemática seguida en el aislamiento e identificación de levaduras.



II.4.4.- MÉTODO DE AISLAMIENTO.

Para aislar las distintas especies de levaduras, se utilizó, la versión moderna del medio glucosa-peptona descrito por Sabouraud en 1849, cuya composición y preparación se ha indicado anteriormente. Se incorpora a este medio 0,5 g de cloranfenicol, antibiótico de amplio espectro para eliminar las contaminaciones bacterianas. Por su estabilidad a altas temperaturas puede incorporarse al medio de cultivo antes de su esterilización. Esta propiedad permite reemplazar ventajosamente la mezcla de penicilina y estreptomycin que habría de añadirse en la superficie de los medios en el momento de su utilización. El medio se distribuyó en placas de Petri (15ml/placa). La siembra de las levaduras se realizó en superficie por agotamiento. Las placas se incubaron durante 24, 48 y 72 horas a 30, 37 y 42 °C, antes de proceder a la observación y estudio del crecimiento.

Macroscópicamente, las levaduras del género *Candida* desarrollan en el medio de Sabouraud colonias de color blanco o color crema, brillante o mate (característica típica de *C. krusei*) y generalmente en relieve. Usualmente, presentan una textura lisa, aunque algunas variedades presentan zonas rugosas, así como un olor característico de levadura. En algunas especies aparecen también pseudohifas, dando a la colonia aspecto estrellado o rizoide. Las diferentes especies de *Candida* producen colonias similares, variando en forma y tamaño, siendo posible la diferenciación de especies sólo microscópicamente. (Fotografías 2 y 3).

Fotografía 2. Colonia de *Candida* en medio de Sabouraud.



Fotografía 3. Colonias de *Candida* en medio de Sabouraud. Aislamiento.



II.4.5.- TEST DE FILAMENTACIÓN EN SUERO.

En 1969 Taschdjian, Burchall y Kozinn (Taschdjian y cols., 1969) introdujeron la prueba de la filamentación de *C. albicans* cuando crece en suero o sustitutos. Demostraron que con esta técnica puede identificarse rápidamente y con fiabilidad la especie *C. albicans*. Desde entonces, se ha generalizado el uso de este técnica en los laboratorios médicos microbiológicos.

El suero empleado se obtuvo en nuestro laboratorio a partir de muestras de sangre disponibles en el mismo. Esta sangre llega al laboratorio en tubos Vacutainer® con silicona. Se deja reposar 10 min. para que se retraiga el coágulo. Posteriormente se centrifuga a una velocidad de 250000 r.p.m. durante 6 min., aproximadamente. Finalmente, se separa el suero por decantación o, en el caso de ser poca la cantidad disponible, por medio de una pipeta Pasteur.

Se tomó con un asa de platino una porción de la levadura y se inoculó en 0,5 ml de suero humano sin sustancias inhibidoras. El suero inoculado se incubó en la estufa a 37 °C, durante un período de tres a cuatro horas, al término del cual se tomó una gota del sedimento formado en el fondo del tubo para su observación microscópica. Se observó al microscopio (x400) y se comprobó la presencia de tubos germinativos, característica diferencial de *C. albicans*. (Fotografía 4).

Fotografía 4. Presencia de tubos germinativos en *C. albicans*.



II.4.6.- CHROMAGAR CANDIDA® (PARÍS, FRANCIA).

El CHROMagar *Candida*® es un medio de cultivo diferencial que facilita el aislamiento y la identificación presuntiva de algunas especies clínicamente importantes, como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, además de la diferenciación de poblaciones de levaduras por la morfología por el contraste de los colores de las colonias producido por la reacción de enzimas específicas de distintas especies con un sustrato cromogénico. Este medio facilita el reconocimiento de mezclas de cultivos de levaduras (Odds y Bernaerts, 1994; Doleans, 1994; Freydière y Gille, 1994; Beighton y cols., 1995; Louwagie y cols., 1995; Anson y Allen, 1997; Bernal y cols., 1996; Baumgartner y cols., 1996; Bouchara y cols., 1996; Freydière, 1996; Pfaller y cols., 1996; San Millán y cols., 1996; Casal y cols., 1997; Houang y cols., 1997; Freydière y cols., 1997; García-Martos y cols., 1997; Ainscough y Kibbler, 1998; García-Martos y cols., 1998; Giusiano y Mangiaterra, 1998; Merlino y cols., 1998; Powell y cols., 1998; Hoppe y Frey, 1999; Koehler y cols., 1999; Willinger y Manafi, 1999).

A.- Composición del medio.

El medio de CHROMagar *Candida*® está compuesto, por litro, de peptona (10 g); glucosa (20 g), agar (15 g), cloranfenicol (0,5 g) y mezcla cromogénica (2 g). Se suministra en forma de polvo blanco y se prepara atendiendo a las instrucciones del fabricante, para lo que se disolvieron 43,5gr de polvo en un litro de agua destilada, y se llevó hasta ebullición con agitación continua, hasta su completa disolución. El medio, que no requiere de esterilización por autoclave, se dispensó en placas de Petri una vez se haya dejado enfriar.

B.- Técnica.

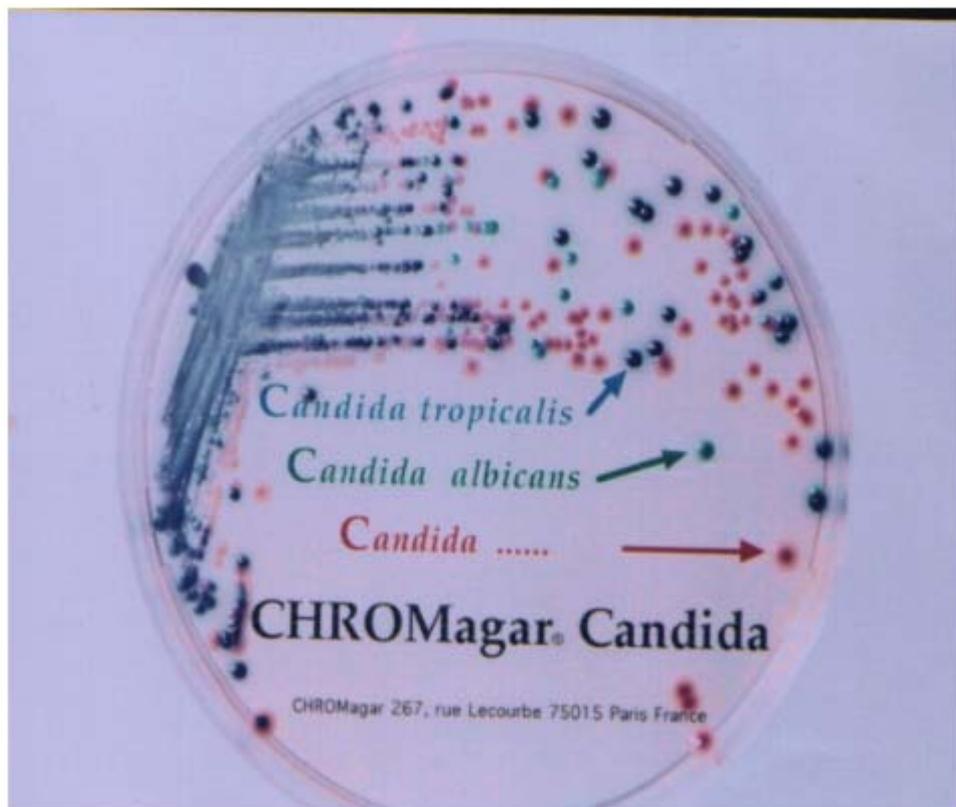
Las levaduras son cultivadas en agar de Sabouraud previamente y mantenidas a 30 ó 37 °C, tras 24 / 48 h, dependiendo del tiempo que cada levadura requiera para crecer, se siembran en CHROMagar *Candida*® y se incuban a 37 °C, examinándose pasados entre uno y dos días de incubación.

C.- Lectura e interpretación.

Después de 24 h de incubación a 30 ó 37 °C, el crecimiento de las levaduras ensayadas y el color de las colonias desarrollado no son consistentes, por lo cual la lectura del color se realizó después de las 48 h de incubación.

C. albicans desarrolla colonias de color verde; *C. tropicalis* se identifica con un distintivo color central azul-gris oscuro y un halo púrpura alrededor. Por otro lado, *C. glabrata* presenta colonias de color marrón; *C. krusei* forma colonias rosa-púrpura, con aspecto rugoso. También se puede identificar, aunque de forma no tan específica, *C. parapsilosis*, que se presenta normalmente en forma de colonias blancas. El color de *Trichosporon* sp. es distintivo, pero variable, formando colonias de color verde-gris. El resto de las especies se distinguen con un color variable que va desde una tonalidad rosa a púrpura, cambiando a las 72 h de incubación. (Fotografía 5).

Fotografía 5. Desarrollo de las colonias de las especies del género *Candida* en Chromagar *Candida*®



II.4.7.- ALBICANS ID2® (MARCY L'ETOILE, FRANCIA)

Albicans ID2® (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) es un medio selectivo de aislamiento que soporta el crecimiento de todas las especies de levadura, incluidas las del *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae*, etc. Contiene un sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosaminida) que es específico para una hexosamidasa que permite la identificación rápida y específica de las colonias de *C. albicans* sobre la base de su color azul (Contreras y cols., 1996).

A.- Composición del medio.

Fórmula teórica en g/l de agua purificada.

Extracto de levadura

Extracto de malta.....6

bioCasa®4,5

Sustrato cromogénico (hexosamina)5

Gentomicina sulfato0,07

Cloranfenicol.....0,1

Agar.....0,05

pH.....6,7

B.- Técnica.

Albicans ID2® está diseñado para detectar levaduras por inoculación directa de muestras patológicas en placas (escobillones de boca, vagina o recto, muestras de heces, pus, piel, escamas, orina, etc.) con el uso de técnicas de rutina. La temperatura de incubación de las placas es de 30 ó 37 °C entre 24 y 48 h.

C.- Lectura e interpretación.

Las placas pueden interpretarse fácilmente a simple vista, sin necesidad de ningún otro reactivo o equipo. Las colonias desarrolladas tienen una forma redonda,

lisa, ligeramente abovedada, con un borde claramente definido. La coloración azulada de una colonia evidenció la presencia *C. albicans*. Esta pigmentación no se difunde dentro del medio y varía de azul pálido al oscuro según el tiempo de incubación. Otras especies de levaduras tienen un color blanco-cremoso.

II.4.8.- CHROMALBICANS® (MILANO, ITALIA)

El CHROMalbicans® (Biolife®, Milano, Italia) es un medio selectivo, debido a la presencia de cloranfenicol y gentamicina, y cromogénico específico para el aislamiento de levaduras y la inmediata identificación de *C. albicans*.

A.- Composición del medio.

Factores de crecimiento	18,50 g/lt
Cloranfenicol	0,05 g/lt
Gentamicina	0,10 g/lt
Triptona	20,00 g/lt
Glucosa	1,00 g/lt
Agar	13,00 g/lt
Sustrato cromogénico	0,10 g/lt

El medio se preparó suspendiendo 52,75 g en 1l de agua destilada. Se agitó hasta la completa disolución y se pone en el autoclave a 115 °C durante 15 minutos. Se enfrió hasta 50 °C y se distribuye en placas de Petri. El pH final es de 6,0 +/- 0,2.

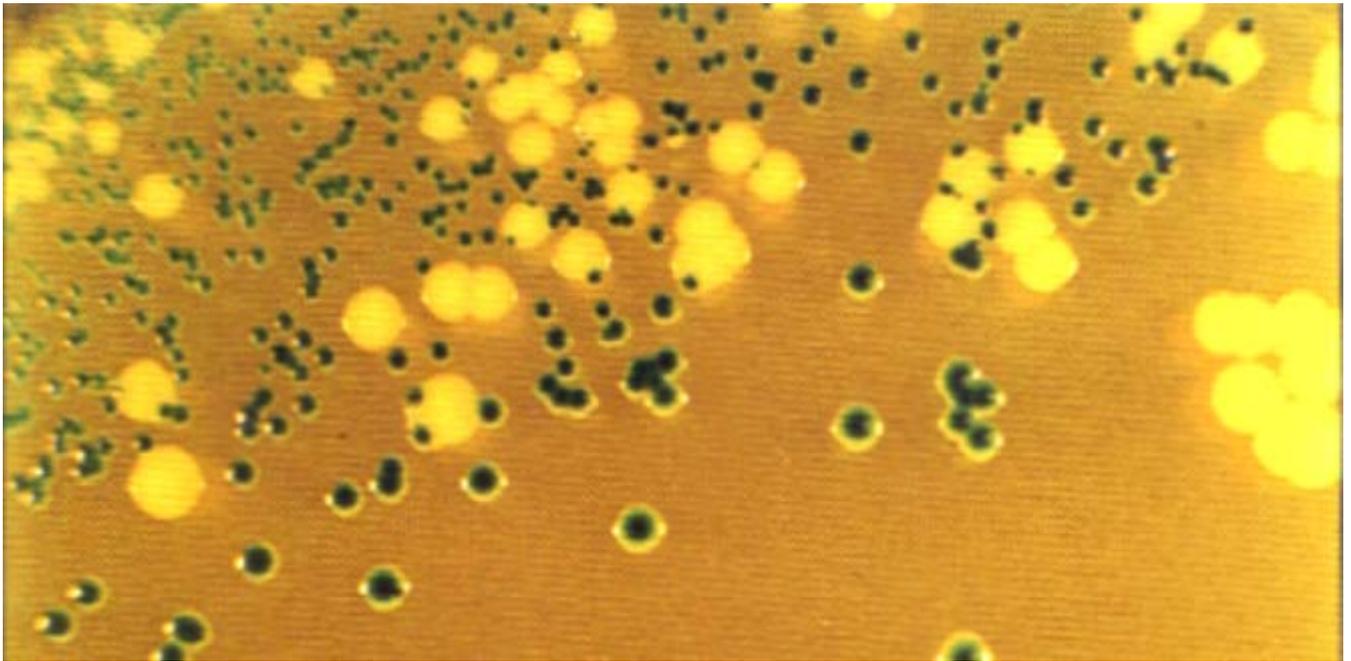
B.- Técnica.

Las muestras patológicas se inocularon directamente el agar CHROMalbicans®. La presencia de sustrato cromogénico en el medio permite poner en evidencia la actividad enzimática de *C. albicans*.

C.- Lectura e interpretación.

El crecimiento de *C. albicans* se visualizó por la aparición de colonias de color azul o azul verdoso después de la incubación a 37 °C durante 24 a 48 h. Otras especies del género *Candida* crecieron desarrollando colonias de color blanco. (Fotografía 6).

Fotografía 6. Desarrollo de las colonias de *C. albicans* en CHROMalbicans Agar®



II.4.9.- **BACTICARD™ CANDIDA®** (KANSAS, USA).

El método Bacticard™ *Candida*® (Remel®, Kansas, USA) es una técnica utilizada para la identificación presuntiva de *C. albicans* por medio de la detección de la actividad de dos enzimas (L-prolina aminopeptidasa y Beta-galactosaminidasa) (Remel, 1993). Incorpora dos reactivos diferentes como son la L-Prolina-Beta-naphtilamida (PRO) y la 4-Metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida (MUGAL)

A.- Técnica.

El método consistió en rehidratar cada uno de los círculos que compone la prueba con una gota de fluido rehidratante e inocular con un aplicador una cantidad de la especie a identificar. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. y a continuación se añadió una gota de revelador de color al círculo de PRO y se observó durante 30 seg. el color desarrollado y una gota del reactivo Candida MUGAL al círculo MUGAL, resultado que se observó en una habitación a oscuras con una pantalla de luz ultravioleta.

B.- Lectura e interpretación.

C. albicans produce una reacción positiva para PRO y MUGAL, es decir, desarrolla color rojo y azul brillante fluorescente, respectivamente. Otras especies de levaduras pueden producir reacciones positivas para PRO ó para MUGAL, pero no para ambas. (Fotografía 7).

Fotografía 7. Bacticard *Candida*



II.4.10.- KRUSEI COLOR® (FRANCIA)

El método de *Krusei color®* (Fumouze®) es fácil y rápido de usar para identificar las colonias de *Candida krusei* directamente de los diferentes cultivos (Bignardi y cols., 1991; Carlotti y cols., 1994; Robert y cols., 1994; Samaranayake y Samaranayake, 1994; Samaranayake y cols., 1994; Iween y cols., 1995; Freydière y cols., 1997; Catálogo Laboratorios Fumouze, 1995).

A.- Técnica.

Las colonias para la realización del ensayo se obtuvieron directamente de cultivos primarios de 24 a 48 aparecidos en cualquier método (agar de Sabouraud, CHROMagar Candida®, Albicans ID®,...), o de las colonias reaisladas a partir del medio sólido de Sabouraud.

Previamente a la realización de la identificación de las colonias se estabilizó la temperatura del reactivo *Krusei-color®* a la temperatura ambiente. Posteriormente se homogenizó la suspensión de látex. Se dispensó, a continuación, una gota del reactivo en un círculo de la cartulina y con una pipeta Pasteur se extrajeron 2 ó 3 colonias. Estas colonias se disociaron en una gota de reactivo y se extendieron completamente por toda la superficie del círculo, hasta que la suspensión fue homogénea. Se balanceó la cartulina con un movimiento rotatorio y se observa la existencia de aglutinamientos de color rojo en un tiempo de 5 min.

B.- Lectura e interpretación.

La reacción se consideró positiva cuando apareció aglutinación roja, identificándose la especie desconocida como *C. krusei*. La reacción fue negativa cuando no se produce aglutinación. La suspensión mantiene su original aspecto homogéneo.

II.4.11.- API ID 32 C® (MARCY-I'ETOILE, FRANCIA)

La galería ID 32 C® es un sistema de identificación que se compone de 32 cúpulas que contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado (bioMérieux, 1998). (Fotografía 8).

Sustratos carbonados:

Sorbitol (SOR)	Galactosa (GAL)
D-xylosa (XYL)	Actidiona (ACT)
Ribosa (RIB)	Sacarosa (SAC)
Glicerol (GLY)	N-acetil-D-glucosamina (NAG)
Ramnosa (RHA)	DL-Lactato (LAT)
Palatinosa (PLE)	L-Arabinosa (ARA)
Eritritol (ERY)	Celobiosa (CEL)
Melibiosa (MEL)	Rafinosa (RAF)
Glucuronato (GRT)	Maltosa (MAL)
Melezitosa (MEL)	Trehalosa (TRE)
Gluconato (GNT)	2-ceto-D-gluconato (2KG)
Levulinato (LVT)	α -metil-D-glucósido (MDG)
Glucosa (GLU)	Manitol (MAN)
Sorbosa (SBE)	Lactosa (LAC)
Glucosamina (GLN)	Inositol (INO)
Esculina (ESC)	Control (O)

A.- Composición del medio.

Sulfato de amonio	5 g
Fosfato monopotásico	0,31 g
Fosfato dipotásico	0,45 g
Fosfato disódico	0,92 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Cloruro de calcio	0,05 g
Sulfato de magnesio	0,2 g

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

Histidina	0,005 g
Triptófano	0,02 g
Metionina	0,02 g
Agar	0,5 g
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de oligoelementos	10 ml
Agua desmineralizada	1 l
pH final	6,5-6,7

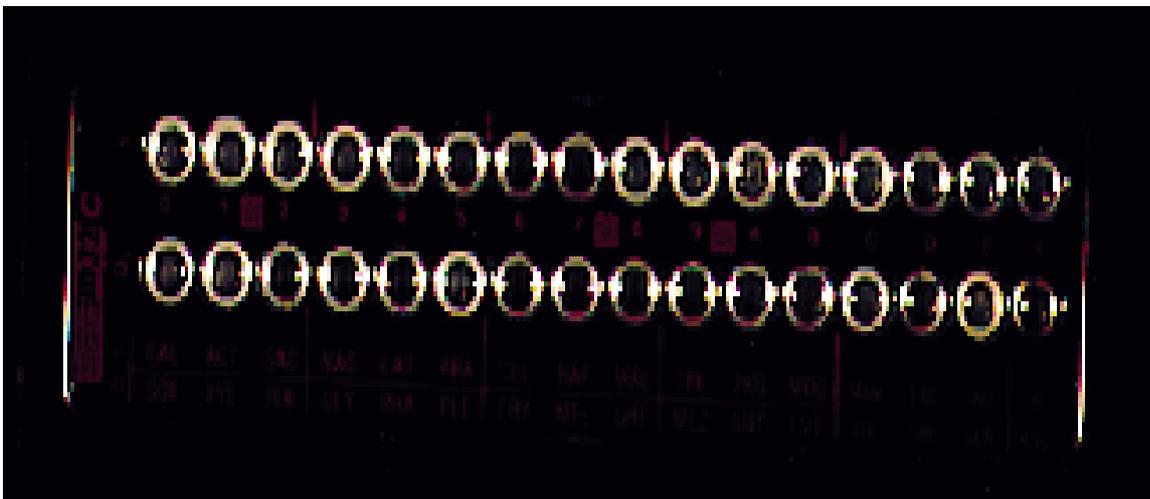
B.-Técnica.

Se preparó a partir de colonias idénticas del medio de aislamiento una suspensión en un tubo con 2 ml de agua destilada sin aditivo, con una turbidez igual al patrón 2 de McFarland. Se transfirieron 250 µl (5 gotas de pipeta de Pasteur) de la suspensión al medio base o ampolla de “C Medium”. Se homogenizó evitando la formación de burbujas. Se procedió a la inoculación de la galería dispensando 135 µl de “C Medium” a cada cúpula. Se tapó la galería y se incubó a 30 °C durante 24-48 h.

C.- Lectura e interpretación.

- Automática por medio del sistema ATB.
- Visual, comparando con el control O y sumando los valores correspondientes a los resultados positivos obteniéndose un perfil numérico en cada grupo. La identificación de la levadura se llevó a cabo utilizando el ID 32 C Index.

Fotografía 8. API ID 32C



II.4.12.- VITEK YEAST BIOCHEMICAL CARD® (HAZELWOOD, MO, USA)

El Vitek Yeast Biochemical Card ® (YBC) (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo) es un sistema automatizado útil en la rápida identificación de levaduras (48 h) clínicamente importantes. Consiste en una tarjeta de plástico con 30 pocillos, 26 de los cuales son pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles negativos. Se usa en conjunción con un sistema automatizado, que incluye un ordenador programado, incubador lector, módulo envase, módulo sellador y la impresora (El-Zaatari y cols., 1990; Liao y cols., 1992; Dooley y cols., 1994; Fenn y cols., 1994; Latouche y cols., 1997; Schulz y cols., 1997; Verweij y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999).

A.- Técnica.

Se tomaron colonias procedentes de un aislamiento primario de 24 o 48 h en medio sólido de Sabouraud. Las suspensiones se obtuvieron en 1,8 ml de solución estéril de 0,45 % de NaCl y con una turbidez equivalente al patrón 2 de la escala de McFarland. Cada inóculo se regularizó con un colorímetro Vitek (450 nm y 46-56 % de transmitancia, correspondiente al grado 2 de la escala de McFarland). Las suspensiones se inocularon en las tarjetas a través del módulo de envase y selladas a continuación, incubándose a 30 °C durante 24 o 48 h, dependiendo de las lecturas.

B.- Lectura e interpretación.

Las tarjetas fueron leídas por el módulo incubador lector. La identificación se basó en la conversión de los resultados del método bioquímico en bicódigos de nueve dígitos, analizados por el ordenador de Vitek. Una identificación aceptable resulta cuando se obtiene probabilidad superior o igual al 85%.

II.4.13.- AUXACOLOR® (MARNE-LA-COQUETTE, FRANCIA)

El Auxacolor ® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette) es un sistema de identificación basado en el principio de asimilación de azúcares. El crecimiento de las levaduras se visualiza por el cambio de color de un indicador de pH (Korth y Pulverer, 1971; Huppert y cols., 1975; Cooper y Silva-Hunter, 1985; Lavarde y cols., 1990; Dupont y cols., 1991; Davey y cols., 1995; Fricker-Hidalgo y cols., 1995; Hantschnke, 1996; Willemsen y cols., 1997; Buchaille y cols., 1998; Sheppard y cols., 1998; Campbell y cols., 1999; Paugam y cols., 1999; Sheppard y cols., 1999; Verweij y cols., 1999; Sanofi Pasteur).

A.- Técnica.

El inóculo se preparó a partir de levaduras crecidas en un medio de Sabouraud de 24 o 48 h, con una opacidad equivalente al control de turbidez suministrado por el fabricante. Se homogenizó la suspensión utilizando la micropipeta (o vórtex), aspirando y expulsando el contenido del vial varias veces. Se distribuyeron 100 µl en cada pocillo de la microplaca. La galería se cubrió posteriormente con una hoja adhesiva y se incubó durante 24 ó 48 h en estufa 30 °C.

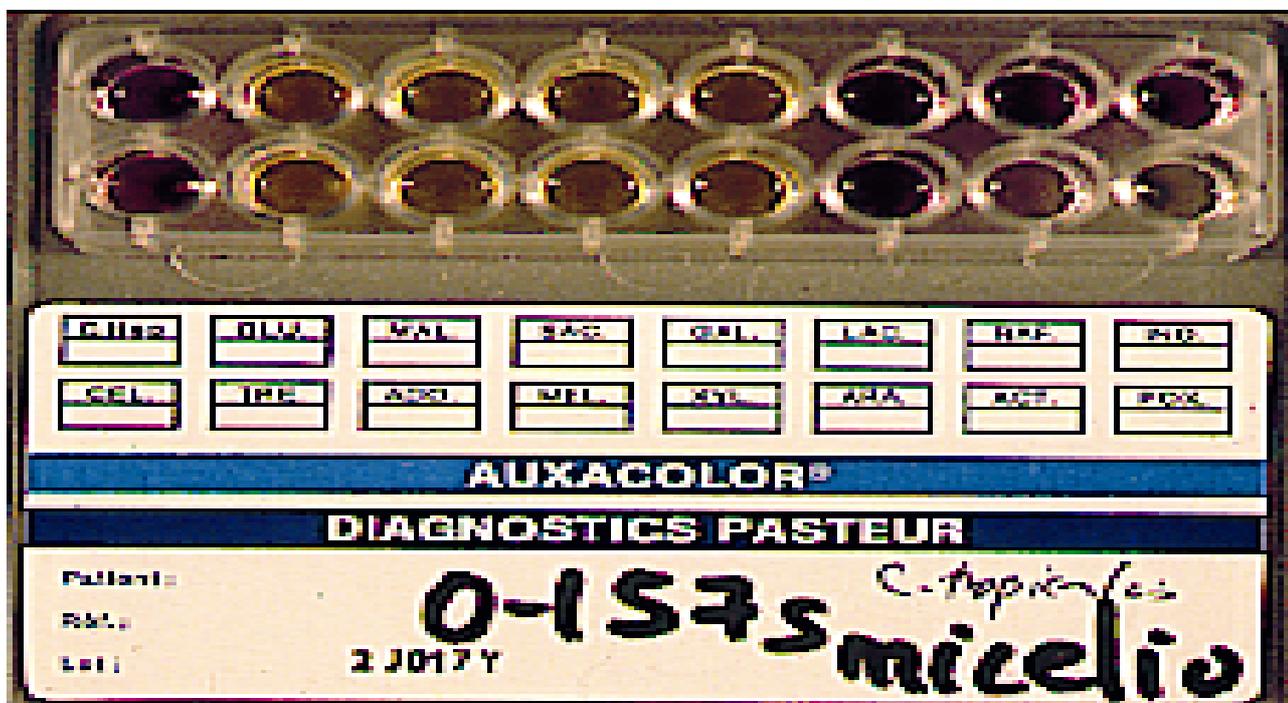
B.- Lectura e interpretación.

Se utilizaron 15 sustratos de características bioquímicas para la identificación que están agrupadas en tripletas para obtener una puntuación numérica.

Glucosa	Galactosa	Inositol	Adonitol	Arabinosa
Maltosa	Lactosa	Celobiosa	Melezitosa	Actidiona
Sacarosa	Rafinosa	Trehalosa	Xilosa	Fenoloxidasa

La lectura de los resultados se realizó aplicando un baremo de puntos de cero para cada reacción negativa y a la reacción positiva se le asigna una puntuación relacionada con su posición en la tripleta. Así “1” para la posición 1; “2” para la posición 2 y “4” para la posición 3. De la suma de las tres puntuaciones se obtiene una cifra de perfil numérico de 5 dígitos, que se interpretó en el código suministrado por el fabricante (Sanofi Pasteur). (Fotografía 9).

Fotografía 9. Auxacolor



II.4.14.- RAPID YEAST PLUS SYSTEM® (NORCROSS, GA., USA)

El RapID Yeast Plus System es un sistema consistente en 18 sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de levaduras: glucosa (GLU), maltosa (MAL), sucrosa (SUC), trehalosa (TRE), rafinosa (RAF), hidrólisis del ester de ácido graso (LIP), p-nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosaminida (NAGA), p-nitrofenil- α -D-glucosido (aGLU), p-nitrofenil- β -D-glucosido (BGLU), o-nitro-fenil- β -D-galactosido (ONPG), p-nitrofenil- α -D-galactosido (aGAL), p-nitrofenil- β -D-fucosido (BFUC), p-nitrofenil-fosfato (PHS), p-nitrofenil-fosforilcolina (PCHO), urea (URE), prolina β -naphthilamida (PRO), histidina β -naphthilamida (HIS), leucilglicil β -naphthilamida (LGY) (Marler y Eriquez, 1995; Kitch y cols., 1996; Buchaille y cols., 1998; Espinel-Ingroff y cols., 1998; Heelan y cols., 1998; Smith y cols., 1999; Verweij y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999; Innovative Diagnostic Systems, Catalog #1-1007).

Reactivos necesarios:

1.- Reactivo A

Buffer	2	%
Hidróxido de potasio	0,5	%

2.- Reactivo B

3-fenil-4-metilaminoacroleina	0,06	%
Ácido hidroclicóric	0,08	%
Ácido acético	1,60	%
Detergente	1	%

A.- Técnica.

Se procedió a la preparación de un inóculo de 2ml a partir de levaduras con suficiente crecimiento sembradas en agar de Sabouraud 48 h antes e incubadas a 30 °C, que se suspendieron en el fluido de inoculación de RapID con una turbidez visual equivalente al patrón 3 de la escala de McFarland. Se homogenizó con la ayuda del vórtex. Cada inóculo se dispensó con la ayuda de una pipeta Pasteur en la esquina

superior derecha de los diferentes paneles. Cada panel se mantuvo inclinado hacia atrás de las celdillas de las pruebas bioquímicas en un ángulo aproximado de 45°. En esta posición, se va moviendo el panel de lado a lado para distribuir el inóculo por toda la parte trasera. Finalmente, se inclinó el panel hacia los pocillos de las diferentes pruebas y se fueron llenando lentamente con el inóculo. Los paneles se incubaron a 30 °C durante 4 h.

B.- Lectura e interpretación

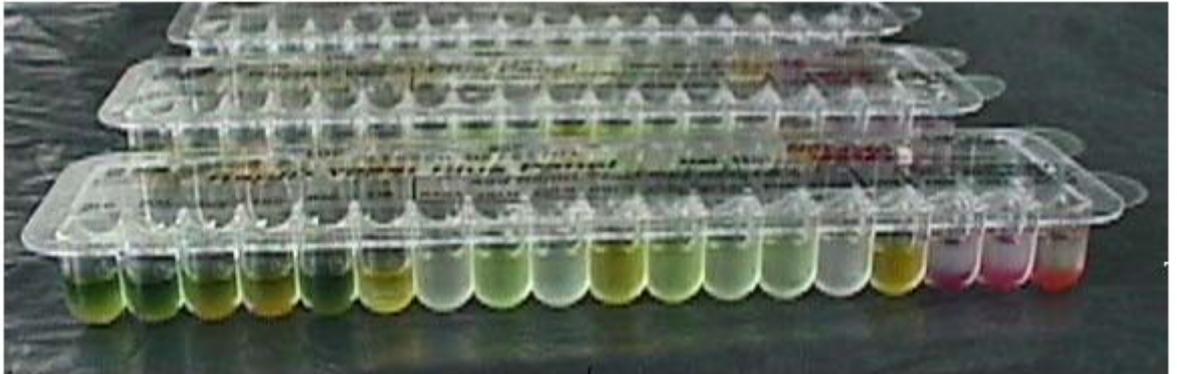
Inmediatamente después de la incubación se añadió el reactivo A, desde las cúpulas 7 (NAGA) a la 14 (PCHO), y el reactivo B, desde la cúpula 16 (PRO) a la 18 (LGY), evaluándose el color de las reacciones obtenidas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de los pocillos del 1 (GLU) al 6 (LIP) y 15 (URE) se observaron sin la adición de reactivo. La reacción se consideró positiva según el color que apareció en los diferentes pocillos, de modo que entre los pocillos 1 al 6, color amarillo; de los pocillos 7 (NAGA) al 14 (PCHO), débilmente amarillo; pocillo 15 (URE), rojo o naranja rojo oscuro; de los pocillos 16 (PRO) al 18 (LGY), púrpura, rojo o rosa oscuro. Se obtuvo un microcódigo de seis dígitos que se comparó con el Compendio de Códigos del RapID Yeast Plus para obtener la identificación de la levadura. (Fotografía 10).

Localización de las cavidades del panel del RapID Yeast Plus System:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA	aGLU	βGLU	ONPG	AGA	βFUC	PHS	PCHO	URE	PRO	HIST	LGY

L

Fotografía 10. Paneles del RapID Yeast Plus System®



II.4.15.- MICROSCAN RAPID YEAST IDENTIFICATION PANEL ® **(CALIF., USA)**

El MicroScan® (Baxter Healthcare Corporation, West Sacramento, Calif., USA) es un sistema enzimático automatizado de identificación de levaduras aisladas en muestras clínicas. Este sistema tasa actividades enzimáticas más que de crecimiento, usando en su mayor parte sustratos cromogénicos e identificando las levaduras en un período de 4 h (Land y cols., 1991; St-Germain y Beauchesne, 1991; Riddle D y cols., 1994).

A.- Composición del medio.

MicroScan se compone de una placa de 96 pocillos de microdilución con 27 sustratos deshidratados, conteniendo 13 aminoácidos β -naftilamidas (HPR (hidroxiprolina- β -naftilamida), ILE (L-isoleucina- β -naftilamida), PRO (L-prolina- β -naftilamida), TYR (L-tirosina- β -naftilamida), GLY (Glicina- β -naftilamida), GGLY (Glicilglicina- β -naftilamida), GLAR (Glicil-L-arginina 4-metoxi- β -naftilamida), GLPR (Glicil-L-prolina-4-metoxi- β -naftilamida), AARG (L-arginil-L-arginina- β -naftilamida), LYAL (L-lisil-L-alanina-4-metoxi- β -naftilamida), ALA (L-alanina-4-metoxi- β -naftilamida), STY (L-seril-L-Tirosina- β -naftilamida), HIS (L-histidina- β -naftilamida)); 3 carbohidratos (SUC1 (Sacarosa), SUC2 (Sacarosa), TRE (Trehalosa)); 9 sustratos nitrofenilos (AGL1 (ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosido), BGL (ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosido), BGAL (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), AGL2 (ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosido), BDF (ρ -nitrofenil- β -fucopiranosido), AGAL (ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosido), NAG (ρ -nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina), CELL (ρ -nitrofenil- α -D-celobiosa), NGAL (ρ -nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosamínida)); 3-indoxil fosfato (IDX) y urea (URE).

B.- Técnica.

Se utilizaron colonias procedentes de un aislamiento primario de 24 h en medio sólido de Sabouraud a 30 °C. A continuación se prepararon las suspensiones emulsionando una muestra de la placa de agar en 3 ml de agua destilada, calibradas frente al patrón de turbidez de levaduras de MicroScan. La suspensión del inóculo de ensayo y los tubos se compararon frente a una superficie blanca con rayas negras de contraste. Las suspensiones se mezclaron hasta que fueron homogéneas. Los pocillos que contienen los sustratos y los pocillos control BNAC (β -naftilamida) y NPC (nitrofenilo) fueron inoculados con 50 μ l de la suspensión. Se apilaron los paneles en grupos de 3 a 5 con una bandeja cubridora encima para evitar la evaporación y se incubaron a 37 °C durante 4 h en un incubador sin CO₂. Las actividades enzimáticas de cada aislamiento se determinaron considerando el cambio de color de los sustratos cromogénicos. Después de la incubación de la placa de microdilución se añadió una gota de 0,05 N de NaOH a los pocillos AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL y NGAL. Se interpretó como positivo cualquier tono amarillo y el control NPC debe ser incoloro.

C.- Lectura e interpretación.

Se añadió una gota de peptidasa a los pocillos BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY y HIS, interpretándose como positivo la presencia de cualquier tono rosa o rojo en todo el pocillo o parte del mismo, pero el control BNAC debe ser de color amarillo.

Tras esperar 30 seg para que se desarrollase el color, el panel se introdujo en el AutoScan-4 para su análisis automatizado, o bien, de forma visual. Los resultados bioquímicos son convertidos en un código de nueve dígitos y comparados con los del libro de códigos de levaduras, generado con la base de datos de MicroScan correspondiente a las pruebas indicadas en el panel.

II.4.16.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Reactivos:

Tampón fosfato Salino (PBS)

NaH ₂ PO ₄	0.386 g
Na ₂ HPO ₄	1.02 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada.....	1 l

Ajustado a pH 7.2

PBS-Azul de Evans-Tween 20 (PBS-ET)

Tween 20.....	0.5 ml
Azul de Evans	0.5 g
PBS.....	1 l

Tampón Carbonato-Bicarbonato

Na ₂ CO ₃	53 g
NaHCO ₃	42 g
Agua destilada.....	1 l

Ajustado a pH 9.0

Glicerina tamponada

Glicerina.....	90 ml
Tampón Carbonato-Bicarbonato	10 ml

A.- Técnica.

1. Crecimiento de las células.

Las cepas se sembraron en medio sólido de Sabouraud (Difco, Detroit, Mich) y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 h. Utilizamos cepas como controles positivos y negativos (Barturen y cols., 1995; Bikandi y cols., 1998).

Para el serotipado de *C. albicans*:

- NCPF 3153 *C. albicans* A (control positivo)

- NCPF 3156 *C. albicans* B (control negativo)

Para la prueba anti-dublinskiensis:

- NCPF 3949 *C. dubliniensis* (control positivo)

- NCPF 3153 *C. albicans* A (control negativo)

2. Fijación de las células

Se preparó una suspensión de células vivas en PBS (10^6 células/ml por recuento hemocitométrico) y se inocularon 10 ml del aislamiento por cada pocillo (en portas de inmunofluorescencia cubiertas de teflón) y se dejaron las células fijando toda la noche a temperatura ambiente.

3. Primera incubación

Se inocularon 10 ml del anticuerpo monoclonal B9E de una dilución 1/10 (para realizar el serotipado de *Candida albicans*) y 10 ml del anticuerpo policlonal anti-*Candida dubliniensis* de una dilución 1/5 (para la identificación de *Candida dubliniensis*).

Se incubaron las células fijadas con 10 ml del anticuerpo diluido en PBS-ET en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.

4. Lavado

Lavado doble de 5-10 min con PBS en agitación suave, con posterior secado de los portaobjetos.

5. Segunda incubación.

Inoculación de 10 ml del anticuerpo anti-IgM de ratón conjugada a FITC (fluoresceína isotiocianatada) de una dilución 1/80 (para realizar el serotipado de *Candida albicans*) y 10 ml del anticuerpo anti-IgG (Sigma®) de conejo de una dilución 1/80 con biotina conjugada (para la identificación de *Candida dubliniensis*).

Incubación de las células fijadas con 10 ml del anticuerpo diluido en PBS-ET en cámara húmeda a 37 °C durante 30 min.

6. Lavado.

Lavado doble de 5-10 min con PBS en agitación suave. Secándose, a continuación los portaobjetos.

B.- Lectura e interpretación

Se montaron los portaobjetos en líquido de glicerol-carbonato tamponado y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 40X. La obtención o no de fluorescencia sirvió para la identificación de *C. dubliniensis* de la forma siguiente:

Verde ⇒ positivo (para el serotipado de *C. albicans* significa serotipo A y para la prueba anti-dubliniensis significa que es *C. dubliniensis*).

Rojo ⇒ negativo (para el serotipado de *C. albicans* significa serotipo B y para la prueba anti-dubliniensis significa que es *C. albicans*).

II.4.17.- PURIFICACIÓN DE LEVADURAS.

Con relativa frecuencia, las colonias de levaduras pueden estar contaminadas con bacterias, y es posible la aparición de dos levaduras distintas. Por ello es necesario, purificar las cepas antes de iniciar los estudios de identificación bioquímica. Los métodos de purificación se basan en la utilización del caldo ácido de Sabouraud, debido a que las bacterias no se desarrollan a pH ácido.

En nuestro estudio, las levaduras se purificaron siguiendo el proceso propuesto por Haley (1971) (Haley, 1971; Larone, 1995; Fisher y Cook, 1998), consistente en utilizar cuatro tubos conteniendo 10 ml de caldo de Sabouraud, a los que se añadieron, respectivamente, una, dos, tres y cuatro gotas de HCl 1,0 N, consiguiendo de esta manera un gradiente de pH. Estos tubos se sembraron luego con una gota de suspensión de la levadura a purificar. La suspensión se preparó tomando una porción de la colonia de levadura, crecida en medio sólido de Sabouraud y haciendo una emulsión con 1 ml de agua destilada estéril. Los caldos de ácido sembrados se dejaron incubar durante 24 h a la temperatura ambiente, procediéndose a continuación a una resiembra de estos caldos en placas de agar sangre, las cuales se incubaron durante 48 h a 37 °C. Si tras las primeras 24 h de incubación todas las colonias crecidas en la placa eran macro y microscópicamente idénticas, la levadura se consideró pura. Entonces, se resembró en una placa con medio de Sabouraud para proceder a su estudio fisiológico.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

II.5.- PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y TIEMPOS VARIABLES.

El estudio de la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación en el crecimiento de las levaduras se realizó sembrando cada una de las cepas a estudiar en tres placas diferentes de medio sólido de Sabouraud e incubando una a 30 °C, otra a 37 °C y otra a 42 °C durante 72 h. Transcurridas las primeras 24 h se observaba si hay crecimiento en las placas y se procedía de la misma forma a las 48 y 72 h.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

II.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS/PC+[®] versión 9 (Statistical Package for Social Sciences) para IBM[®]. El nivel de riesgo aceptado para todos los contrastes de hipótesis fue $<0,05$.

II.6.1.- CONCORDANCIA.

Estadístico utilizado para variables cualitativas y la confección de tablas de contingencia, de las cuales se puede obtener el grado de concordancia entre dos pruebas diferentes sobre una misma población (índice de Kappa). Este índice estadístico indica la proporción de acuerdo potencial por encima del azar que obtienen distintas mediciones de un mismo hecho. Su valor oscila entre +1, si el grado de acuerdo es total, y -1, si no existe acuerdo en absoluto (Kramer, 1981; Carrillo-Muñoz, 1994).

$\geq 0,8 \leq 1$ Concordancia casi perfecta

$\geq 0,6 \leq 0,8$ Concordancia excelente

$\geq 0,4 \leq 0,6$ Concordancia moderada

$\geq 0,2 \leq 0,4$ Concordancia intermedia

$\geq 0,0 \leq 0,2$ Concordancia baja

$\geq -1 \leq 0,0$ Concordancia pobre

II.6.2.- COMPARACIÓN ENTRE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

Estudio de una técnica dada en una población diferente empleándose el X^2 (corregido) y la confección de tablas de contingencia para el contraste de la hipótesis de independencia entre dos variables (Kozinn, 1978).

Sensibilidad es el porcentaje de cepas correctamente discriminadas en la prueba por medio de resultados positivos (positivos verdaderos). Sensibilidad: n° de positivos verdaderos \times 100/(n° de positivo verdaderos + n° de falsos negativos).

$$\frac{PV \times 100}{PV + FN}$$

Especificidad es el porcentaje de cepas correctamente discriminadas con resultados negativos en la prueba. Especificidad: n° de verdaderos negativos \times 100/(n° de verdaderos negativos + n° de falsos positivos).

$$\frac{NV \times 100}{NV + FP}$$

II.6.3.- COMPARACIÓN ENTRE EFICIENCIA Y VALOR PREDICTIVO

Eficiencia es el porcentaje de cepas correctamente discriminadas o, en su caso, identificadas.

Eficiencia: $(n^{\circ}$ de positivos verdadero + n° de negativos verdaderos) \times 100/total

$$\frac{(PV + NV) \times 100}{PV + NV + FP + FN}$$

Valor predictivo positivo es el porcentaje de cepas con la prueba positiva. Valor predictivo positivo: n° de positivos verdadero \times 100/(n° de positivo verdaderos + n° de falsos positivos).

$$\frac{PV \times 100}{PV + FP}$$

Valor predictivo negativo es el porcentaje de cepas con la prueba negativa. Valor predictivo negativo: n° de negativos verdaderos \times 100/(n° de negativo verdaderos + n° de falsos negativos).

$$\frac{NV \times 100}{NV + FN}$$

(Kozinn, 1978; Baumgartner y cols., 1996; San-Millán y cols., 1996).

II.6.4.- $P < 0,05$.

El nivel de riesgo aceptado para todos los contrastes de hipótesis es de 0,05.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

III.- RESULTADOS.

III.1.- TOTAL DE LEVADURAS ENSAYADAS.

El total de los aislados estudiados fue de 537, de los cuales 484 procedían del Hospital Universitario de Canarias (Tenerife) y 53 fueron remitidos desde otros hospitales con el fin de abarcar las principales especies del género *Candida* en nuestro estudio.

III.2.- LEVADURAS IDENTIFICADAS CON EL API ID 32C®.

Se han identificado por el método API ID 32C® un total de 534 (99,4 %) levaduras aisladas de las muestras procesadas, procedentes tanto del Hospital Universitario de Canarias como de los distintos centros hospitalarios que formaron parte de nuestro estudio (Tabla XXI). Los resultados obtenidos muestran un claro predominio de la especie *C. albicans* (46,6 %), seguido por *C. parapsilosis* (14,6 %), *C. tropicalis* (13,3 %), *C. glabrata* (9,2 %) y *C. lusitaniae* (3,7 %). El resto de especies del género *Candida* de importancia clínica se han identificado en menor proporción, como es el caso de *C. famata* (1,7 %), *C. guilliermondii* y *C. krusei* (1,5 %). Y porcentajes muy inferiores de aislamiento e identificación correspondieron a *C. inconspicua*, *C. intermedia* y *C. meliobiosica* con un 0,4 y *C. globosa*, *C. humicola* y *C. norvengensis* con un 0,2.

También han sido identificadas otras levaduras pertenecientes a otros géneros distintos del género *Candida*, como es el caso del género *Rhodotorula*, con *R. rubra* (1,5 %), *R. glutinis* (0,6 %) y *R. minuta* (0,4 %); el género *Cryptococcus*, con *Cr. neoformans* y *Cr. laurentii* (0,7 %) y *Cr. unigutulatus* (0,4 %); el género *Trichosporon*, con *T. cutaneum* en una proporción del 0,6 % y *T. capitatum* con el 0,2 %. El resto de las especies aisladas correspondieron a *P. etchell/carsonii* (0,6 %), *S. cerevisiae* (0,4 %) y *Zigosaccharomyces* spp. (0,2 %).

En la figura 7 se muestran los porcentajes de identificación obtenidos de *C. albicans* y *Candida no albicans* por medio de esta técnica. Destaca un 46,6 % de especies *C. albicans* frente al 53,4 % de especies distintas a ésta. En la figura 8 aparecen gráficamente los valores porcentuales de las especies del género *Candida* identificadas en mayor frecuencia, mientras que en la figura 9 se representan aquellas especies identificadas en menor porcentaje. En la figura 10 se observan los géneros y especies de otras levaduras identificadas con el API ID 32C®.

Al realizarse la reproducibilidad del API ID 32C® se observó que todas las cepas de referencia ensayadas reprodujeron en las tres ocasiones el mismo resultado, confirmando su identificación.

Tabla XXI. Identificación de levaduras con el sistema API ID 32C.

	Frecuencia	Porcentaje
<i>Candida albicans</i>	249	46,6
<i>C. parapsilosis</i>	78	14,6
<i>C. tropicalis</i>	71	13,3
<i>C. glabrata</i>	49	9,2
<i>C. lusitaniae</i>	20	3,7
<i>C. famata</i>	9	1,7
<i>C. guilliermondii</i>	8	1,5
<i>C. krusei</i>	8	1,5
<i>C. inconspicua</i>	2	0,4
<i>C. intermedia</i>	2	0,4
<i>C. meliobiosica</i>	2	0,4
<i>C. globosa</i>	1	0,2
<i>C. humicola</i>	1	0,2
<i>C. norvengensis</i>	1	0,2
<i>Rhodotorula rubra</i>	8	1,5
<i>R. glutinis</i>	3	0,6
<i>R. minuta</i>	2	0,4
<i>Cryptococcus laurentii</i>	4	0,7
<i>Cr. neoformans</i>	4	0,7
<i>Cr. unigutulatus</i>	2	0,4
<i>Trichosporon cutaneum</i>	3	0,6
<i>T. capitatum</i>	1	0,2
<i>Prototheca etchell/carsonii</i>	3	0,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	0,4
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	0,2
Total	534	100

FIGURA 7
ESPECIES DE *C. ALBICANS* Y NO ALBICANS
IDENTIFICADAS CON EL API ID 32C

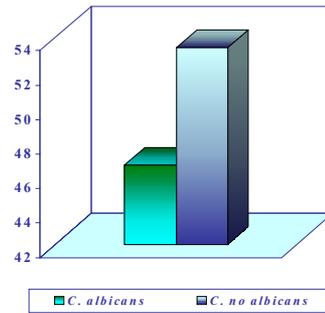
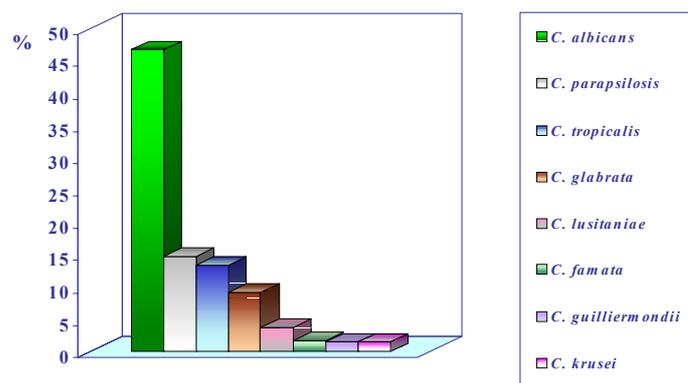
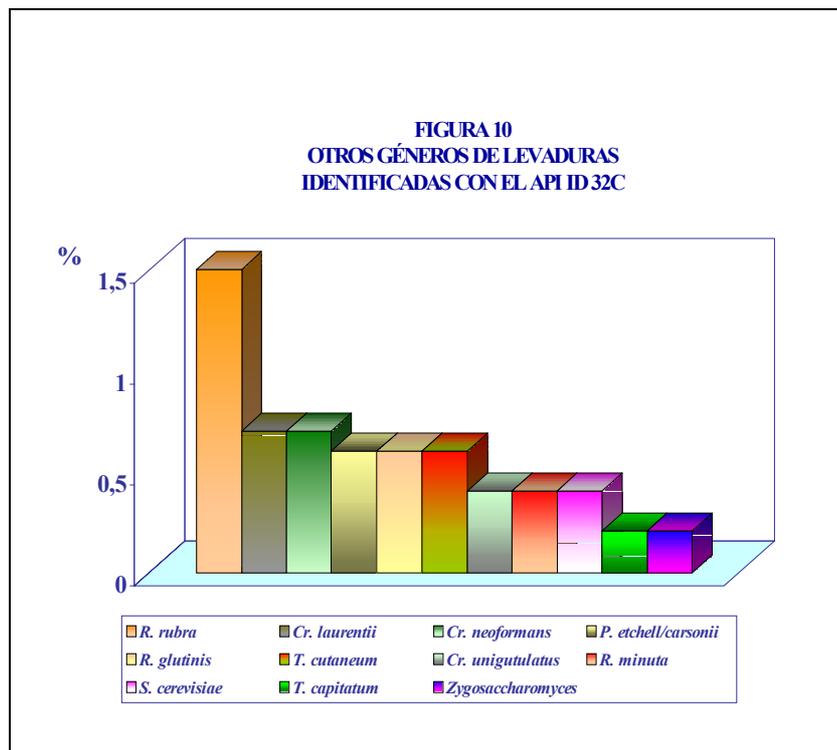
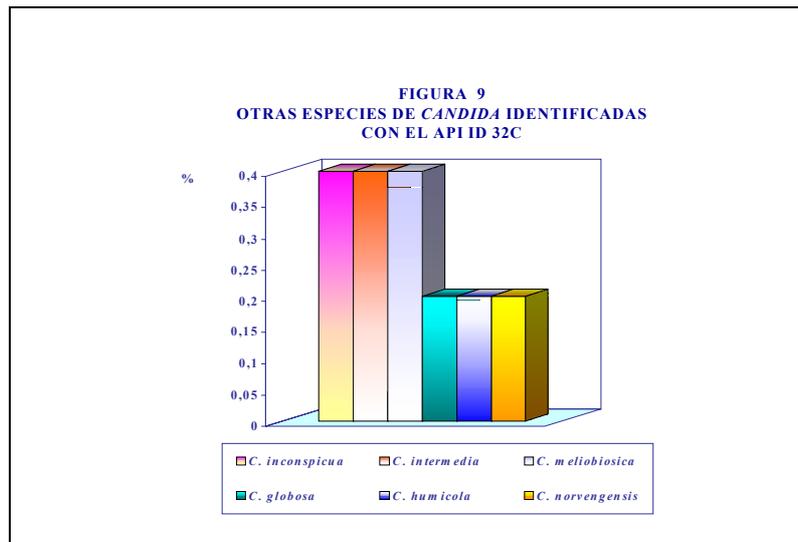


FIGURA 8
ESPECIES DE *CANDIDA* IDENTIFICADAS
CON MÁS FRECUENCIA CON EL API ID 32C



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

III.3.- FRECUENCIA DE CULTIVOS MIXTOS.

En el análisis de los resultados obtenidos en el laboratorio a partir de las muestras recibidas del H.U.C., se observó la existencia de crecimiento de dos o más especies en 22 de ellas, aislándose un total de 45 levaduras distintas que han sido identificadas. La identificación de estas especies, procedencia orgánica y Servicio se resumen en la tabla XXII.

Tabla XXII. Especies aisladas en los diferentes cultivos mixtos.

Servicio	Procedencia orgánica	Especies aisladas
Cirugía general	Catéter	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>
Dermatología	Piel	<i>R. minuta</i> + <i>C. inconspicua</i>
	Uñas	<i>C. humicola</i> + <i>P. etchell/carsonii</i>
	Uñas	<i>C. globosa</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Uñas	<i>Cr. unigutulatus</i> + <i>R. glutinis</i> + <i>C. albicans</i>
	Uñas	<i>Cr. laurentii</i> + <i>T. cutaneum</i>
	Uñas	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Uñas	<i>R. glutinis</i> + <i>C. guilliermondii</i>
	Uñas	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Uñas	<i>C. tropicalis</i> + <i>P. etchell/carsonii</i>
	Uñas	<i>C. famata</i> + <i>C. guilliermondii</i>
Ginecología	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. famata</i>
	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
Hematología	Coprocultivo	<i>S. cerevisiae</i> + <i>R. rubra</i>
	Vagina	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>
Neumología	Muestras respiratorias	<i>R. rubra</i> + <i>C. albicans</i>
	Muestras respiratorias	<i>C. albicans</i> + <i>C. meliobiosica</i>
U.V.I	Orina	<i>C. lusitaniae</i> + <i>C. glabrata</i>
	Orofaringe	<i>C. famata</i> + <i>R. glutinis</i>

45

Total

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

III.4.- DISTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS SEGÚN PROCEDENCIA ORGÁNICA.

En este apartado se presentan los resultados de las distintas levaduras identificadas por medio del método de referencia, atendiendo a la procedencia orgánica de las mismas.

III.4.1.- Aislados de levaduras en muestras vaginales.

En las **muestras vaginales** la especie predominante resultó ser *C. albicans* (61,1 %), seguido de *C. glabrata* (16,7 %), *C. parapsilosis* (12 %), *C. krusei* (3,7 %), *R. rubra* (2,8 %) y en un porcentaje de 0,9 % las especies de *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *Cryptococcus laurentii*. Tabla XXIII y figura 11.

Tabla XXIII. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras vaginales.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	66	61,1
<i>C. glabrata</i>	18	16,7
<i>C. parapsilosis</i>	13	12
<i>C. krusei</i>	4	3,7
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	2,8
<i>C. famata</i>	1	0,9
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,9
<i>C. tropicalis</i>	1	0,9
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0,9
Total	108	100

III.4.2.- Aislados de levaduras en orinas.

En **orina** las especies aisladas fueron en orden decreciente *C. albicans* (53,2 %), *C. tropicalis* (22,3 %), *C. parapsilosis* (10,6 %), *C. glabrata* (10,6 %) y *C. lusitaniae* (3,2 %). Tabla XXIV y figura 12.

Tabla XXIV. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en orina.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	50	53,2
<i>C. tropicalis</i>	21	22,3
<i>C. glabrata</i>	10	10,6
<i>C. parapsilosis</i>	10	10,6
<i>C. lusitaniae</i>	3	3,2
<u>Total</u>	94	100

III.4.3.- Aislados de levaduras en uñas.

En las muestras de **uñas** aislamos con mayor frecuencia *C. parapsilosis* (40,8 %), seguido por *C. albicans* (10,5 %), *C. guilliermondii* (7,9 %), *C. famata* (6,6 %), *C. tropicalis* (6,6 %), *P. etchell/carsonii* (3,9 %) y en un porcentaje de 2,6 % las especies *C. intermedia*, *Cr. laurentii*, *Cr. unigutulatus*, *R. glutinis*, *R. rubra* y *T. cutaneum*. En un 1,3 % las especies *C. glabrata*, *C. globosa*, *C. humicola*, *C. lusitaniae*, *R. minuta* y *Zygosaccharomyces*. Tabla XXV y figura 13.

Tabla XXV. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en uñas.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida parapsilosis</i>	31	40,8
<i>C. albicans</i>	8	10,5
<i>C. guilliermondii</i>	6	7,9
<i>C. famata</i>	5	6,6
<i>C. tropicalis</i>	5	6,6
<i>Prototheca etchell/carsonii</i>	3	3,9
<i>C. intermedia</i>	2	2,6
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	2,6
<i>Cr. unigutulatus</i>	2	2,6
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	2,6
<i>R. rubra</i>	2	2,6
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	2,6
<i>C. glabrata</i>	1	1,3
<i>C. globosa</i>	1	1,3
<i>C. humicola</i>	1	1,3
<i>C. lusitaniae</i>	1	1,3
<i>R. minuta</i>	1	1,3
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	1,3
Total	76	100

III.4.4.- Aislados de levaduras en hemocultivos.

En la tabla XXVI y figura 14 se observa que la especie más aislada en **hemocultivo** resultó ser *C. albicans* (40,4 %), seguida de *C. glabrata* (22,8 %), *C. tropicalis* (17,5 %), *C. parapsilosis* (10,5 %), *C. inconspicua* (3,5 %) y en 1,7 % *C. famata*, *C. krusei* y *Cr. laurentii*.

Tabla XXVI. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras de hemocultivo.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	23	40,4
<i>C. glabrata</i>	13	22,8
<i>C. tropicalis</i>	10	17,5
<i>C. parapsilosis</i>	6	10,5
<i>C. inconspicua</i>	2	3,5
<i>C. krusei</i>	2	1,7
<i>C. famata</i>	1	1,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	1,7
<u>Total</u>	57	100

III.4.5.- Aislados de levaduras en muestras de exudado de herida.

En la tabla XXVII y figura 15 se muestran los aislados obtenidos en las muestras de **exudado de herida**, donde se aisló con un número mayor *C. albicans* (36,8 %), seguida en una proporción muy similar de *C. tropicalis* (34,2 %), *C. parapsilosis* (18,4 %), *C. glabrata* (5,3 %) y ya en porcentajes más bajos se aislaron con un 2,6 % las especies *C. krusei* y *T. capitatum*.

Tabla XXVII. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras de exudado de herida.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	14	36,8
<i>C. tropicalis</i>	13	34,2
<i>C. parapsilosis</i>	7	18,4
<i>C. glabrata</i>	2	5,3
<i>C. krusei</i>	1	2,6
<i>Trichosporon capitatum</i>	1	2,6
<u>Total</u>	38	100

III.4.6.- Aislados de levaduras en coprocultivos.

C. albicans (56 %) sigue siendo la especie aislada en mayor porcentaje en coprocultivos, frente a *C. glabrata* y *C. tropicalis* ambos aislados con el 12 %. En una proporción menor (4 %) se aislaron *C. lusitaniae*, *C. meliobiosica*, *C. parapsilosis*, *R. rubra* y *S. cerevisiae*. Tabla XXVIII y figura 16.

Tabla XXVIII. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en coprocultivo.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	14	56
<i>C. glabrata</i>	3	12
<i>C. tropicalis</i>	3	12
<i>C. lusitaniae</i>	1	4
<i>C. meliobiosica</i>	1	4
<i>C. parapsilosis</i>	1	4
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	4
<u>Total</u>	25	100

III.4.7.- Aislados de levaduras en catéter.

En las muestras de **catéter** ha sido *C. tropicalis* con un 40,9 % la especie aislada con más frecuencia, le sigue *C. albicans* (36,4 %), *C. parapsilosis* (13,6 %) y solamente en un 4,5 % se identificó *C. glabrata* y *C. norvengensis*. Tabla XXIX y figura 17.

Tabla XXIX. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en catéteres.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida tropicalis</i>	9	40,9
<i>C. albicans</i>	8	36,4
<i>C. parapsilosis</i>	3	13,6
<i>C. glabrata</i>	1	4,5
<i>C. norvengensis</i>	1	4,5
<u>Total</u>	22	100

III.4.8.- Aislados de levaduras en muestras respiratorias.

C. albicans (61,9 %) fue la especie más prevalente en **muestras respiratorias**. Con porcentajes netamente inferiores también se aislaron *C. tropicalis* (14,3 %), *C. parapsilosis* (9,5 %), *C. glabrata* y *C. meliobiosica* (4,8 %), ambas. Tabla XXX y figura 18.

Tabla XXX. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras respiratorias.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	13	61,9
<i>C. tropicalis</i>	3	14,3
<i>C. parapsilosis</i>	2	9,5
<i>C. glabrata</i>	1	4,8
<i>C. meliobiosica</i>	1	4,8
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	4,8
<u>Total</u>	21	100

III.4.9.- Aislados de levaduras en otras muestras.

Los resultados de los aislados obtenidos de muestras de L.C.R., un total de 9, quedan reflejados en la figura 19 y tabla XXXI. *Cryptococcus neoformans* (44,4 %) fue la especie predominante, *C. albicans* y *C. tropicalis* en un 22,2 % y *C. parapsilosis* en un 11,1 %).

Tabla XXXI. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en L.C.R.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	44,4
<i>Candida albicans</i>	2	22,2
<i>C. tropicalis</i>	2	22,2
<i>C. parapsilosis</i>	1	11,1
<u>Total</u>	9	100

En **piel**, un total de 7 muestras, se aislaron *C. parapsilosis* (37,5 %), *C. albicans* (25 %), *C. krusei* y *R. minuta* en un 12,5 %, como se muestra en la figura 20 y en la tabla XXXII.

Tabla XXXII.- Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en piel.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida parapsilosis</i>	3	37,5
<i>C. albicans</i>	2	25
<i>C. krusei</i>	1	12,5
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	12,5
<u>Total</u>	7	100

En muestras de **exudado orofaríngeo** se aislaron *C. albicans* (40 %), *C. famata*, *C. tropicalis* y *R. glutinis* en un 20 % (tabla XXXIII). Mientras que en **otros líquidos orgánicos** se encontraron como las especies mayormente aisladas *C. albicans* y *C. tropicalis* con un 66,7 % y 16,7 %, respectivamente. Y en una proporción inferior *C. parapsilosis* y *T. capitatum* con un 8,3 % (tabla XXXIV). En las figuras 21 y 22 se representan estos resultados.

Tabla XXXIII. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras de exudado orofaríngeo.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	2	40
<i>C. famata</i>	1	20
<i>C. tropicalis</i>	1	20
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	20
<u>Total</u>	5	100

Tabla XXXIV. Especies del género *Candida* y otras levaduras aisladas en muestras de otros líquidos.

Especies	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	8	66,7
<i>C. tropicalis</i>	2	16,7
<i>C. parapsilosis</i>	1	8,3
<i>Trichosporon capitatum</i>	1	8,3
<u>Total</u>	5	100

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 11
AISLADOS EN MUESTRAS VAGINALES

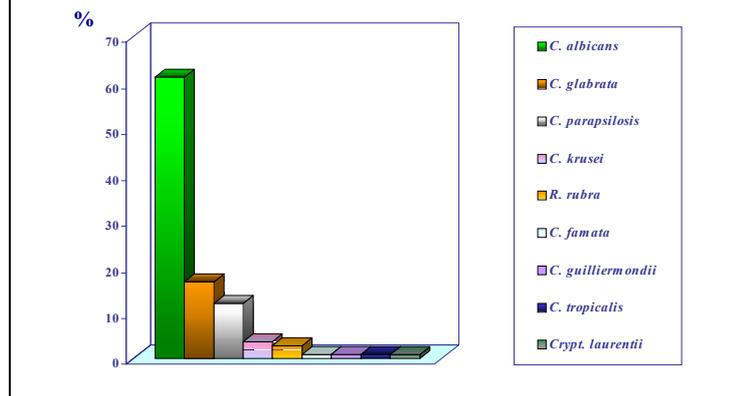
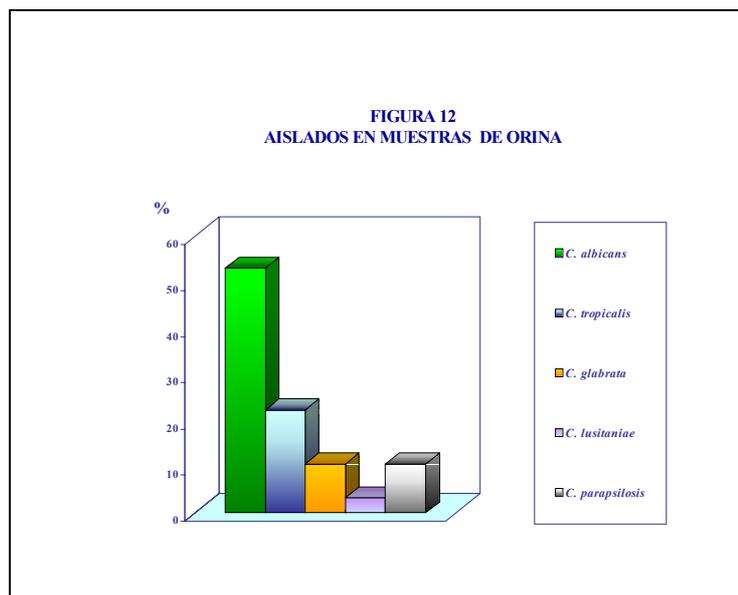


FIGURA 12
AISLADOS EN MUESTRAS DE ORINA



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

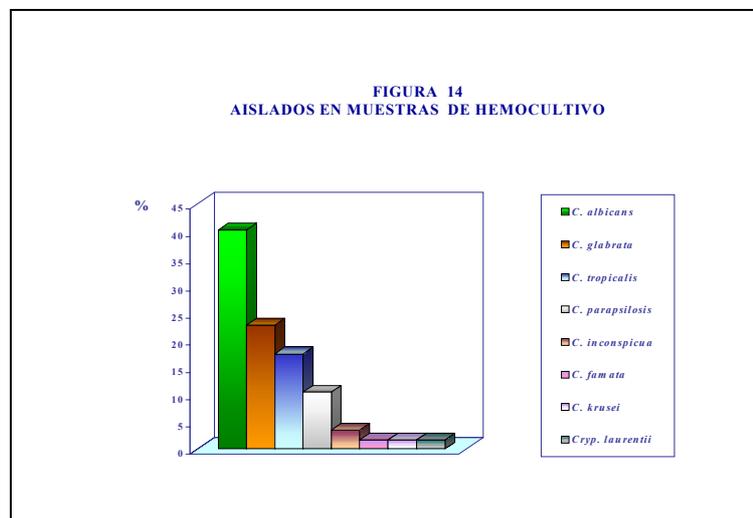
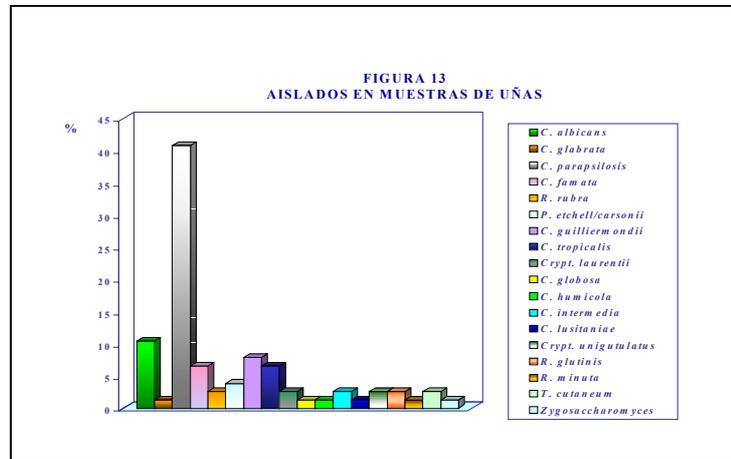


FIGURA 15
AISLADOS EN MUESTRAS DE EXUDADO DE HERIDA

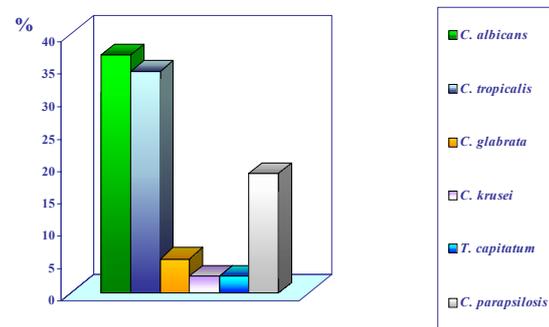
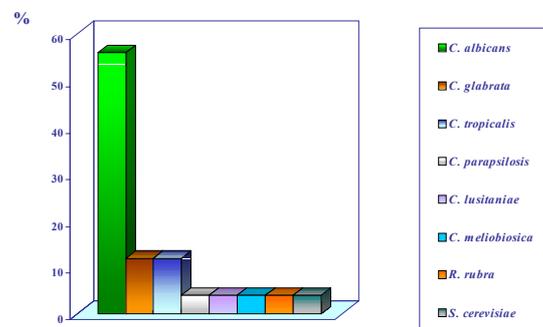


FIGURA 16
AISLADOS EN MUESTRAS DE COPROCULTIVO



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 17
AISLADOS EN MUESTRAS DE CATÉTER

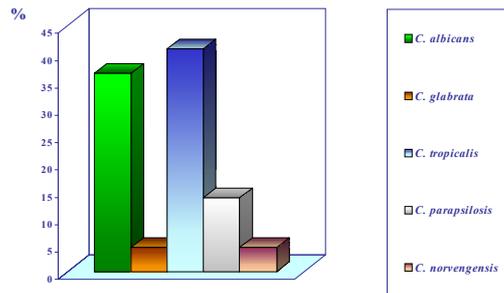


FIGURA 18
AISLADOS EN MUESTRAS DE MUESTRAS RESPIRATORIAS

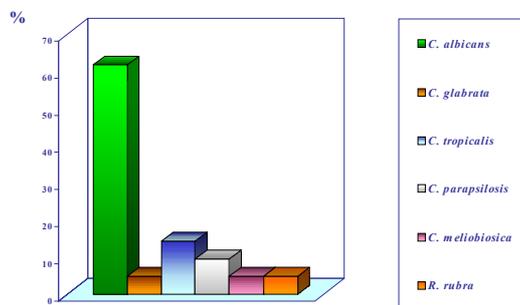


FIGURA 19
AISLADOS EN MUESTRAS DE L.C.R.

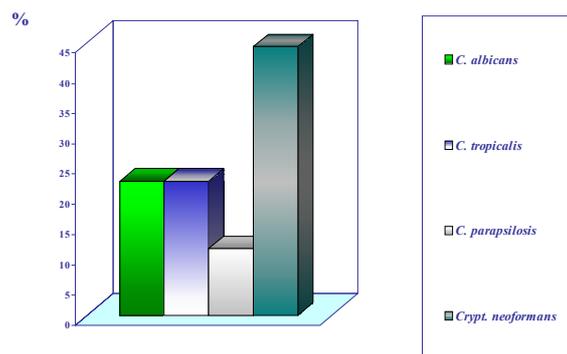
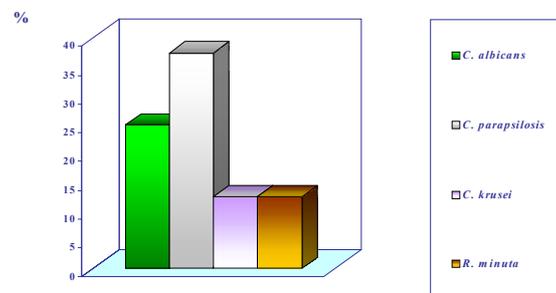


FIGURA 20
AISLADOS EN MUESTRAS DE PIEL



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 21
AISLADOS EN MUESTRAS DE EXUDADO OROFARÍNGEO

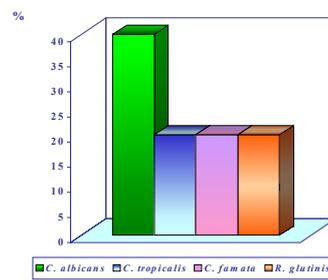
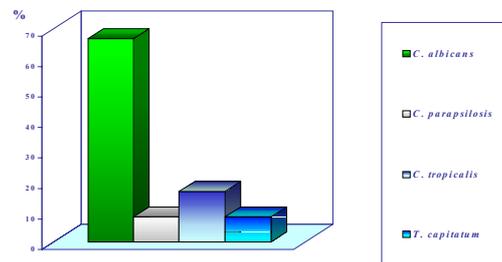


FIGURA 22
AISLADOS EN MUESTRAS DE LÍQUIDOS



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

III.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE LEVADURAS POR OTRAS TÉCNICAS.

III.5.1.- TEST DE FILAMENTACIÓN EN SUERO.

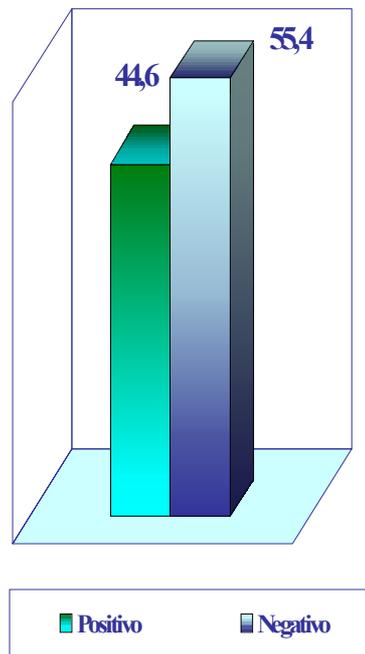
La prueba de formación del tubo germinativo, test de filamentación en suero, ha sido realizada para 527 aislados. El resultado ha sido positivo para el 44,6 % de los mismos, lo que permite la identificación presuntiva de 235 levaduras como *C. albicans*. Por el contrario, ha resultado negativa para el 55,4 % de aislados como se muestra en la figura 23, que son identificados como pertenecientes a otras especies del género *Candida*, o bien, a levaduras pertenecientes a otros géneros. Estos resultados obtenidos al realizar el test de filamentación en suero a los diferentes aislados se recogen en la tabla XXXV.

Por otro lado, con el test de filamentación en suero no se ha observado el desarrollo de tubo germinativo en ninguno de los ensayos para las cepas de referencia.

Tabla XXXV. Test de filamentación.

Resultado	Identificación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Negativo	<i>C. no albicans</i>	292	55,4
Positivo	<i>C. albicans</i>	235	44,6
	<u>Total</u>	527	100

FIGURA 23
FILAMENTACIÓN



III.5.2.- ALBICANS ID 2®.

Se han identificado 426 cepas con el método Albicans ID2®. Los resultados obtenidos indican un porcentaje de identificación de *C. albicans* del 39,9 %, frente a un 60,1 % que son identificadas como otras especies, como se muestra en la tabla XXXVI y en la figura 24.

Tabla XXXVI. Distribución de aislados de levaduras identificados con el *Albicans ID2®*.

	Frecuencia (n=426)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	170	39,9
No <i>albicans</i>	256	60,1
<u>Total</u>	426	100

Se observó una correcta reproducibilidad de la técnica, verificándose en todos los ensayos los mismos resultados; de forma que, a excepción de la cepa *C. albicans* ATCC90028, todas las restantes no desarrollaron colonias de color verde.

III.5.3.- CHROMALBICANS®

Se ha procesado un total de 353 aislados. De ellos, el 53 % desarrolla en este medio de cultivo colonias de color azul, características de *C. albicans*, mientras que el resto de las especies lo hacen en forma de colonias de color blanco (41,1 %). No obstante, un pequeño porcentaje de levaduras desarrollaron colonias de color blanco-azul (5,9 %), que no permite una clara definición en el momento de la identificación. (Tabla XXXVII y figura 25).

Al realizarse los ensayos de reproducibilidad del CHROMalbicans® se ha comprobado que todas las cepas han coincidido en sus resultados.

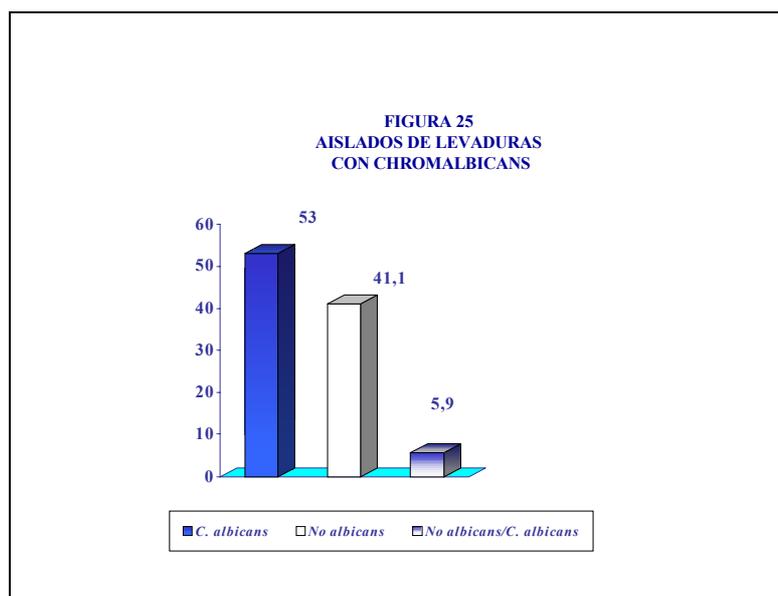
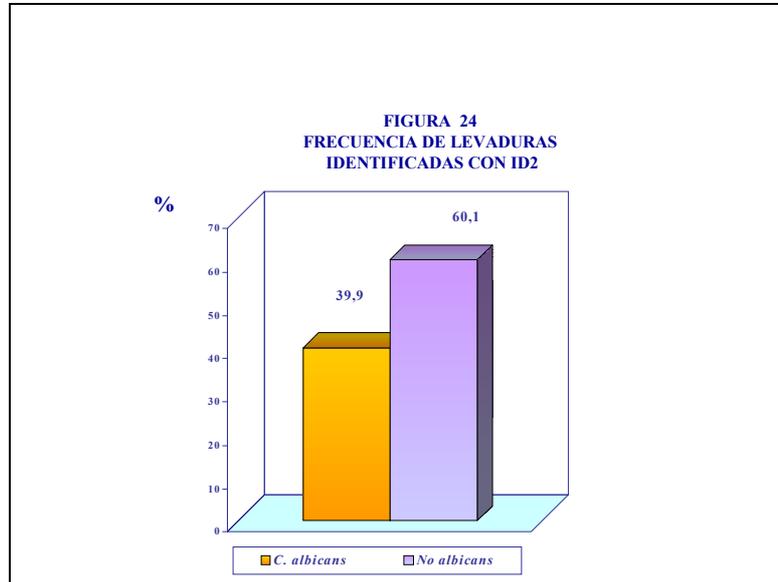


Tabla XXXVII. Resultados obtenidos con el CHROMAlbicans® agar.

Resultados	Identificación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Azul	<i>C. albicans</i>	187	53
Blanco	<i>C. no albicans</i>	145	41,1
Blanco/Azul	<i>C. no albicans</i>	21	5,9
	<u>Total</u>	353	100

III.5.4.- BACTICARD-CANDIDA®

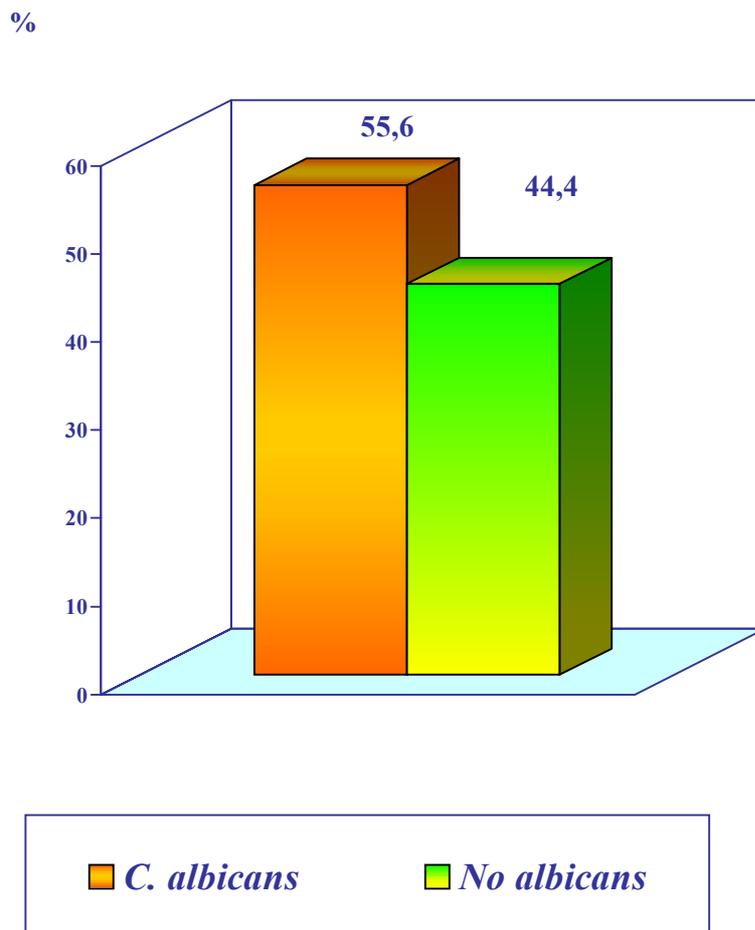
De las 351 identificaciones realizadas con la técnica BactiCard-Candida®, el 55,6 % de aislados presentaron reacción positiva a PRO (círculo de color rojo) y a MUGAL (círculo con fluorescencia azul), siendo interpretados como *albicans*. Y las especies identificadas como *Candida no albicans* (44,4 %) en el círculo PRO no desarrollan color y/o en el círculo MUGAL no presenta fluorescencia. Los resultados obtenidos con esta técnica figuran en la tabla XXXVIII y en la figura 26.

Tabla XXXVIII. Distribución de los aislados de levaduras identificadas con el Bacticard-Candida®.

Identificación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	195	55,6
No <i>albicans</i>	156	44,4
	<u>Total</u>	351

La reproducibilidad de esta técnica ha resultado correcta, mostrando resultados idénticos en todas las ocasiones.

FIGURA 26
FRECUENCIA DE LEVADURAS IDENTIFICADAS
CON BACTICARD CANDIDA



III.5.5.- CHROMAGAR CANDIDA®

En la tabla XXXIX y en la figura 27 se observan los resultados obtenidos al final del procesamiento de todos los aislados de levaduras en el medio de cultivo CHROMagar-Candida®. Las 524 cepas identificadas se han distribuido de la siguiente forma: El 46,7 % desarrolla colonias de color verde en la superficie del CHROMagar Candida®, por lo que fueron identificadas como *C. albicans*. Esto permite diferenciarlas de otras especies con otras pigmentaciones obtenidas, como es el caso de *C. tropicalis* (15,3 %) con colonias de color azul oscuro con un halo púrpura oscuro. *C. glabrata* (8,2 %) se desarrolla en este medio con un color rosa-marrón oscuro brillante. Asimismo, las especies del género *Rhodotorula* (2,5 %) forman colonias de color naranja. Un 1,7 % de los aislados produjo colonias blancas con esferas centrales rosadas, identificadas como *C. krusei*. Las colonias de las distintas especies del género *Trichosporon* (0,8%) aparecen con una coloración azul verdoso.

El resto de las especies ensayadas (24,8 %), entre las que se incluyen especies como *C. parapsilosis*, no se han podido identificar de manera concluyente al desarrollar colonias con un espectro de tonalidades que van desde blanco a rosa púrpura.

En la figura 28 se representa la distribución de las especies de *C. albicans* y *C. no albicans* identificadas en nuestro estudio en un porcentaje de 46,7 % y 53,3 %, respectivamente, por medio del método CHROMagar-Candida®.

Los resultados de identificación, por medio del método CHROMagar-Candida®, han sido uniformes para todas las cepas de referencia durante los distintos ensayos de reproducibilidad. Sólo la cepa ATCC 90028 ha producido colonias de color verde, típicas de *C. albicans*, en una de las ocasiones. En el resto de los ensayos la pigmentación obtenida ha sido blanca.

Tabla XXXIX. Distribución de los aislados de levaduras identificadas con el CHROMagar *Candida*®.

Color	Género/Especie	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Verde	<i>C. albicans</i>	245	46,7
Azul	<i>C. tropicalis</i>	80	15,3
Marrón	<i>C. glabrata</i>	43	8,2
Naranja	<i>Rhodotorula</i> spp.	13	2,5
Blanco-Rosado	<i>C. krusei</i>	9	1,7
Azul verdoso-blanco	<i>Trichosporon</i> spp.	4	0,8
Blanco a rosa púrpura	Otras especies	130	24,8
	<u>Total</u>	524	100

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 27
ESPECIES DE *C. ALBICANS* Y NO ALBICANS
IDENTIFICADAS CON CHROMAGAR CANDIDA

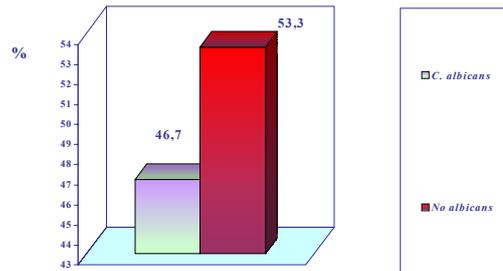
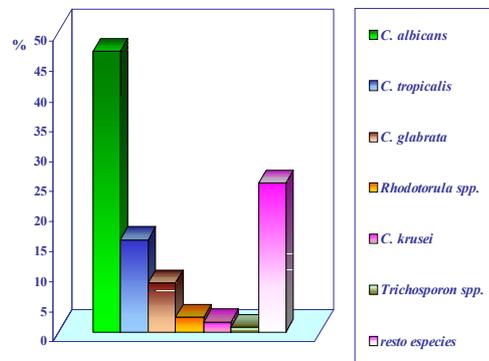


FIGURA 28
FRECUENCIA DE LEVADURAS IDENTIFICADAS
CON CHROMAGAR CANDIDA



III.5.6.- MICROSCAN RAPID YEAST IDENTIFICATION®.

En la tabla XL se recogen los resultados de la identificación obtenidos por medio de la técnica de MicroScan Rapid Yeast Identification® para las 183 cepas de levaduras estudiadas, correspondiendo un 35 % de las especies a *C. albicans*, un 20,8 % a *C. parapsilosis*, un 19,7 % a *C. tropicalis*, un 7,1 % a *C. glabrata*, un 4,9 % a *C. lusitaniae*, un 2,7 % a *C. krusei* y el resto de las especies identificadas se encuentran en una proporción inferior a 1,5 %.

En la figura 29 se observa la distribución de todos los aislados atendiendo a los diferentes géneros encontrados. Destacando el género *Candida*, con una proporción del 93,8 %; le sigue las especies del género *Rhodotorula*, en un 2,1 %, con un 1,6 % está *Prototheca* spp. y los géneros *Cryptococcus* spp. y *Trichosporon* spp. con un 1,1 %.

En la figura 30 se muestra la distribución de *C. albicans* (35 %) y *C. no albicans* (65 %) identificadas por este método.

En la figura 31 pueden observarse las distintas especies de *Candida* y los porcentajes en que han sido identificadas.

En la figura 32 aparecen las diferentes especies de los restantes géneros. *R. rubra* está en una proporción de 1,6 %, en un 1,1 % *T. beigeli*, *Cr. neoformans*, *P. wickerhamii* y en una proporción de 0,5 % destacamos a *Prototheca* spp., *R. glutinis* y *S. cerevisiae*.

En todos los ensayos, los resultados obtenidos al realizar la reproducibilidad del MicroScan Rapid Yeast Identification® coincidieron.

Tabla XL. Distribución de los aislados de levaduras identificadas por medio del MicroScan Rapid Yeast Identification®.

Género y especie.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	64	35
<i>C. parapsilosis</i>	38	20,8
<i>C. tropicalis</i>	36	19,7
<i>C. glabrata</i>	13	7,1
<i>C. lusitaniae</i>	9	4,9
<i>C. krusei</i>	5	2,7
<i>C. ater</i>	3	1,6
<i>C. catenulata</i>	1	0,5
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,5
<i>C. rugosa</i>	1	0,5
<i>C. zeylanoides</i>	1	0,5
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	1,6
<i>R. glutinis</i>	1	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	1,1
<i>Prototheca wickerhamii</i>	2	1,1
<i>Prototheca sp.</i>	1	0,5
<i>Trichosporon beigeli</i>	2	1,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,5
<u>Total</u>	183	100

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 29
ESPECIES DE *C. ALBICANS* Y NO ALBICANS
IDENTIFICADAS CON MICROSCAN

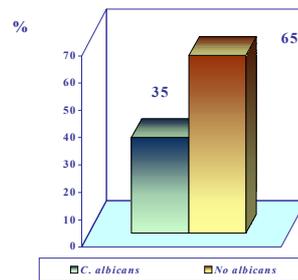
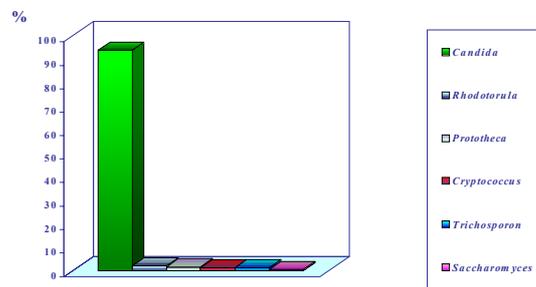


FIGURA 30
DIFERENTES GÉNEROS IDENTIFICADOS
CON MICROSCAN



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 31
LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* IDENTIFICADAS
CON MICROSCAN

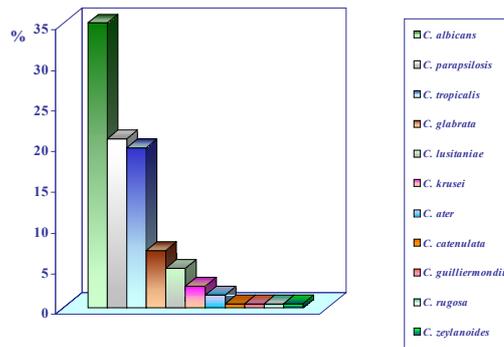
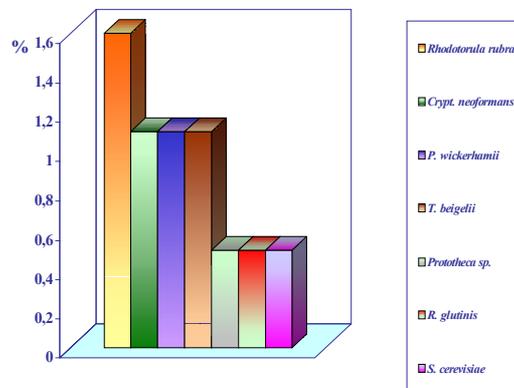


FIGURA 32
OTRAS ESPECIES DE LEVADURAS IDENTIFICADAS CON MICROSCAN



III.5.7.- VITEK YEAST BIOCHEMICAL CARD®

Se han identificado 158 aislados por medio de la técnica Vitek Yeast Biochemical Card®, de los cuales en mayor proporción se ha encontrado *C. albicans* en un 27,9 %; *C. parapsilosis* en un 21,5%; *C. tropicalis* en un 16,5 %; *C. lusitaniae* en un 12 %; *C. glabrata* en un 7,6 % y *P. ohmeri* en un 3,8 %. *C. humicola* y *C. krusei* con un 1,9 % y *C. famata* y *C. guilliermondii* con un 1,3 %, cada una. *C. zeylanoides* aparece con una proporción del 0,6 %. Estos resultados figuran en la tabla XLI.

En la figura 33 se representa la distribución de los diferentes géneros identificados, correspondiendo el mayor porcentaje al género *Candida*, con un 92,5 %, le siguen los géneros *Pichia* con un 3,8 %, *Cryptococcus* en un 1,2 % y *Blastomyces*, *Saccharomyces*, *Prototheca* y *Trichosporon* con un 0,6 %, respectivamente.

En la figura 34 puede observarse la distribución de las especies de *C. albicans* y *C. no albicans*, en las proporciones de 27,9 % y 72,1 %, respectivamente.

En la figura 35 aparecen las distintas especies del género *Candida*, siendo la especie más prevalente *C. albicans*; le siguen en orden decreciente *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* y en menor proporción, *C. humicola*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* y *C. zeylanoides*.

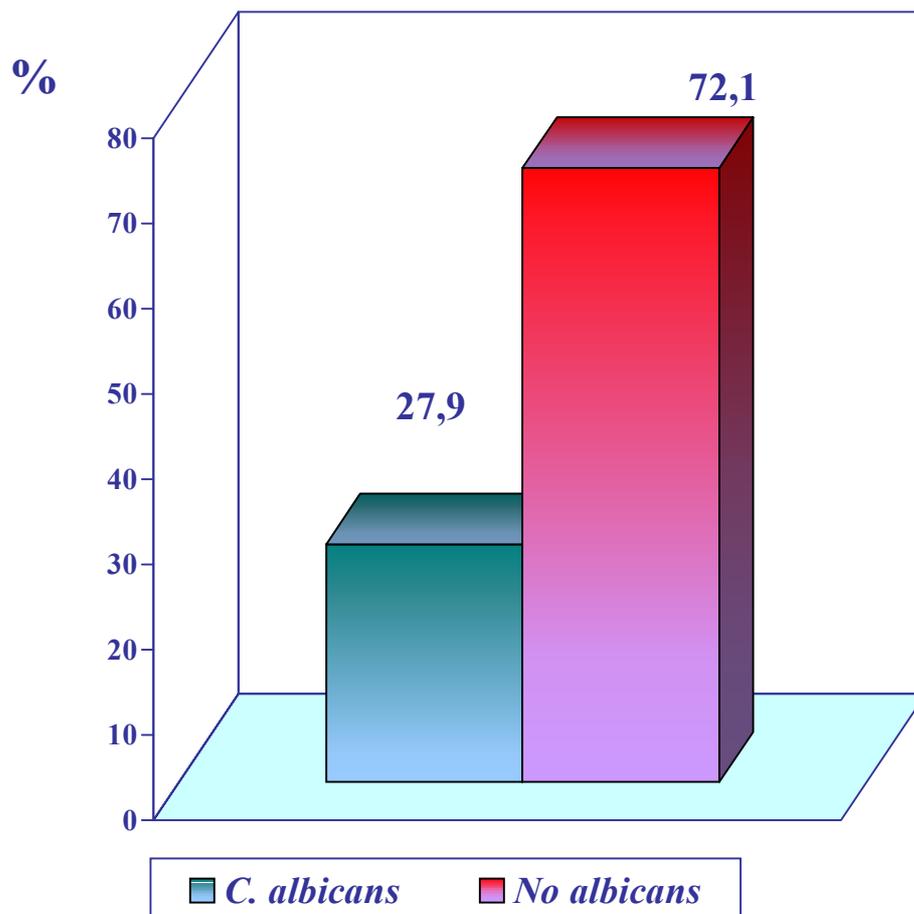
Al realizar las identificaciones de las cepas de referencia con el Vitek® los resultados no han sido concordantes en todos los ensayos. Las cepas ATCC 200952, ATCC 200959, ATCC 42720, ATCC 64125, ATCC 90018, ATCC 90028 y ATCC 22019, han coincidido en todos los casos en la identificación. En el resto de las cepas de referencia las identificaciones no han sido reproducibles. La cepa *C. lusitaniae* ATCC 200950 en una ocasión se identificó como *C. parapsilosis*. La cepa *C. lusitaniae* ATCC 200953 no ha podido ser identificada correctamente en ningún caso. La cepa *C. lusitaniae* ATCC 66035 no pudo ser identificada en una ocasión. En

el caso de *C. krusei* ATCC 6258, se identificó como *Geotrichum capitatum* en un ensayo y como *C. krusei* en el resto.

Tabla XLI. Distribución de los aislados de levaduras con el Vitek Yeast Biochemical Card®.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	44	27,9
<i>C. parapsilosis</i>	34	21,5
<i>C. tropicalis</i>	26	16,5
<i>C. lusitaniae</i>	19	12
<i>C. glabrata</i>	12	7,6
<i>C. humicola</i>	3	1,9
<i>C. krusei</i>	3	1,9
<i>C. famata</i>	2	1,3
<i>C. guilliermondii</i>	2	1,3
<i>C. zeylanoides</i>	1	0,6
<i>Pichia ohmeri</i>	6	3,8
<i>Blastomyces capitatus</i>	1	0,6
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0,6
<i>Cr. neoformans</i>	1	0,6
<i>Prototheca sp.</i>	1	0,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,6
<i>Trichosporon beigelii</i>	1	0,6
Total	158	100

FIGURA 33
ESPECIES DE *C. ALBICANS* Y NO ALBICANS
IDENTIFICADAS CON VITEK



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 34
DIFERENTES GÉNEROS IDENTIFICADOS
CON VITEK

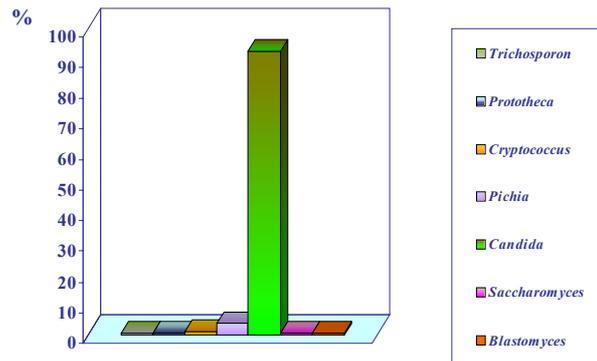
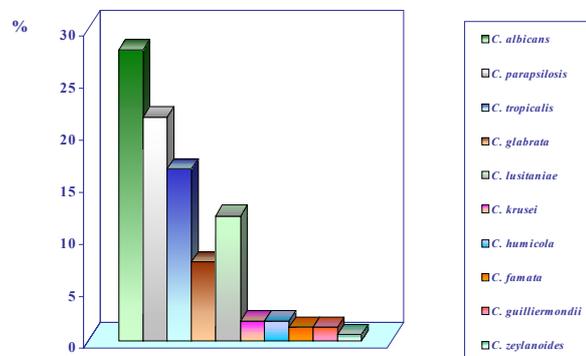


FIGURA 35
LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA
IDENTIFICADAS CON VITEK



III.5.8.- RAPID YEAST PLUS SYSTEM®

Las especies identificadas con el RapID Yeast Plus System en un total de 107 siguen la distribución que se recoge en la tabla XLII. De ellas un 50,5 % se han identificado como *C. albicans*; 13,1 % *C. tropicalis*; 12,2 % *C. parapsilosis*; 3,7 % *R. glutinis*; 2,8 % *C. lusitaniae*; 1,9 % *C. krusei*, *C. zeylanoides* y *C. stellatoidea*. En proporciones inferiores se encuentran el resto de las especies (0,9 %). Un 3,7 % de aislados procesados por esta técnica, no ha podido ser finalmente identificados.

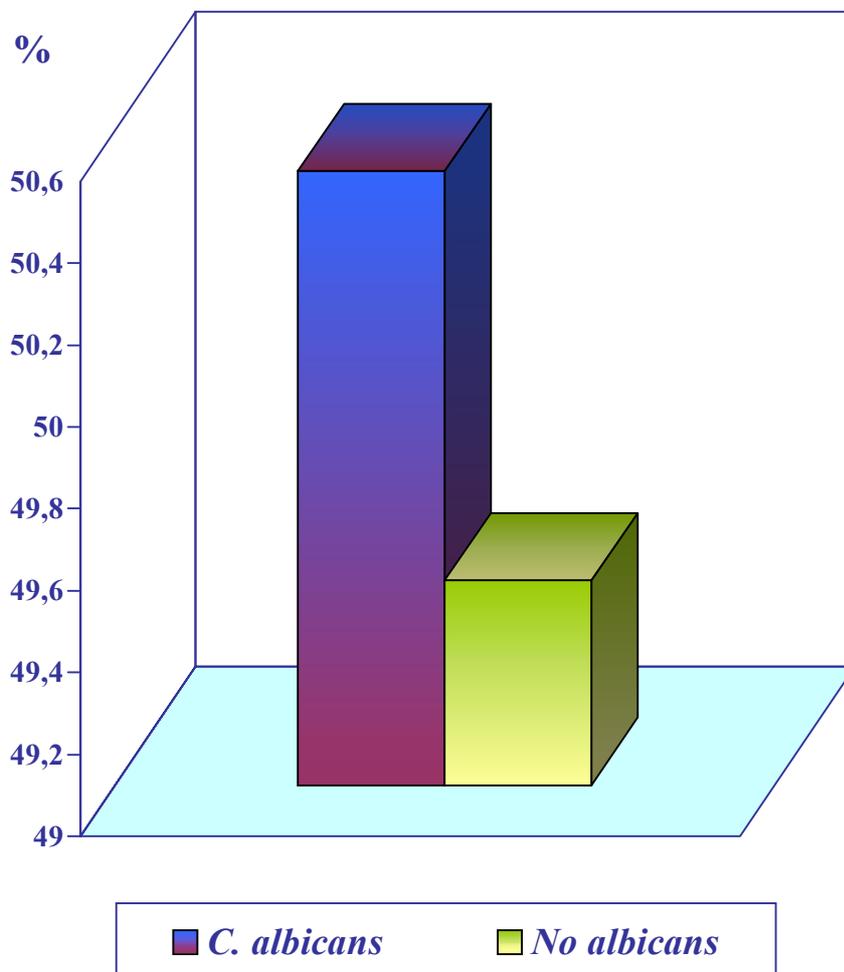
En la figura 36 se representa la distribución de las distintas especies de *C. albicans* y *C. no albicans* en la proporción de 50,5 % y 49,5 %, respectivamente.

Las diferentes especies del género *Candida* se muestran en la figura 37. La frecuencia de las especies correspondientes a otros géneros aislados se presenta en la figura 38.

Tabla XLII. Distribución de los aislados de levaduras identificados por medio de la técnica RapID Yeast Plus System®.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	54	50,5
<i>C. tropicalis</i>	14	13,1
<i>C. parapsilosis</i>	13	12,2
<i>C. lusitaniae</i>	3	2,8
<i>C. krusei</i>	2	1,9
<i>C. stellatoidea</i>	2	1,9
<i>C. zeylanoides</i>	2	1,9
<i>Candida</i> spp.	1	0,9
<i>C. glabrata</i>	1	0,9
<i>C. humicola</i>	1	0,9
<i>C. rugosa</i>	1	0,9
<i>Rhodotorula glutinis</i>	4	3,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0,9
<i>Geotrichum</i> sp.	1	0,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,9
<i>Torulopsis candida</i>	1	0,9
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	0,9
No identificable	4	3,7
Total	109	100

FIGURA 36
ESPECIES DE *C. ALBICANS* Y NO ALBICANS
IDENTIFICADAS CON RAPID YEAST PLUS SYSTEM



LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 37
ESPECIES DE *CANDIDA* IDENTIFICADAS
CON RAPID YEAST PLUS SYSTEM

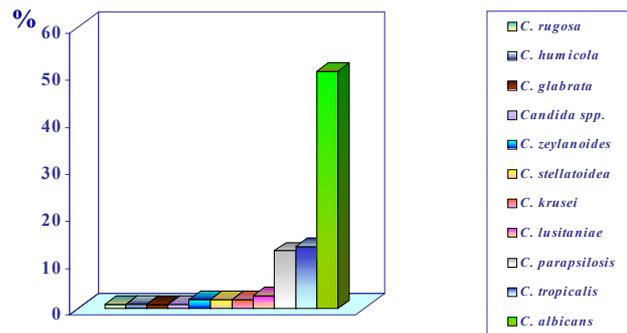
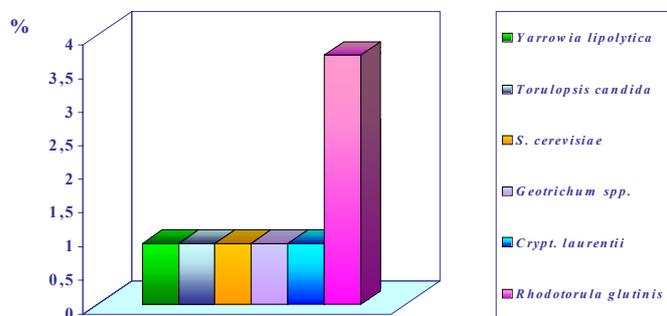


FIGURA 38
OTRAS ESPECIES DE LEVADURAS
IDENTIFICADAS CON RAPID YEAST PLUS SYSTEM



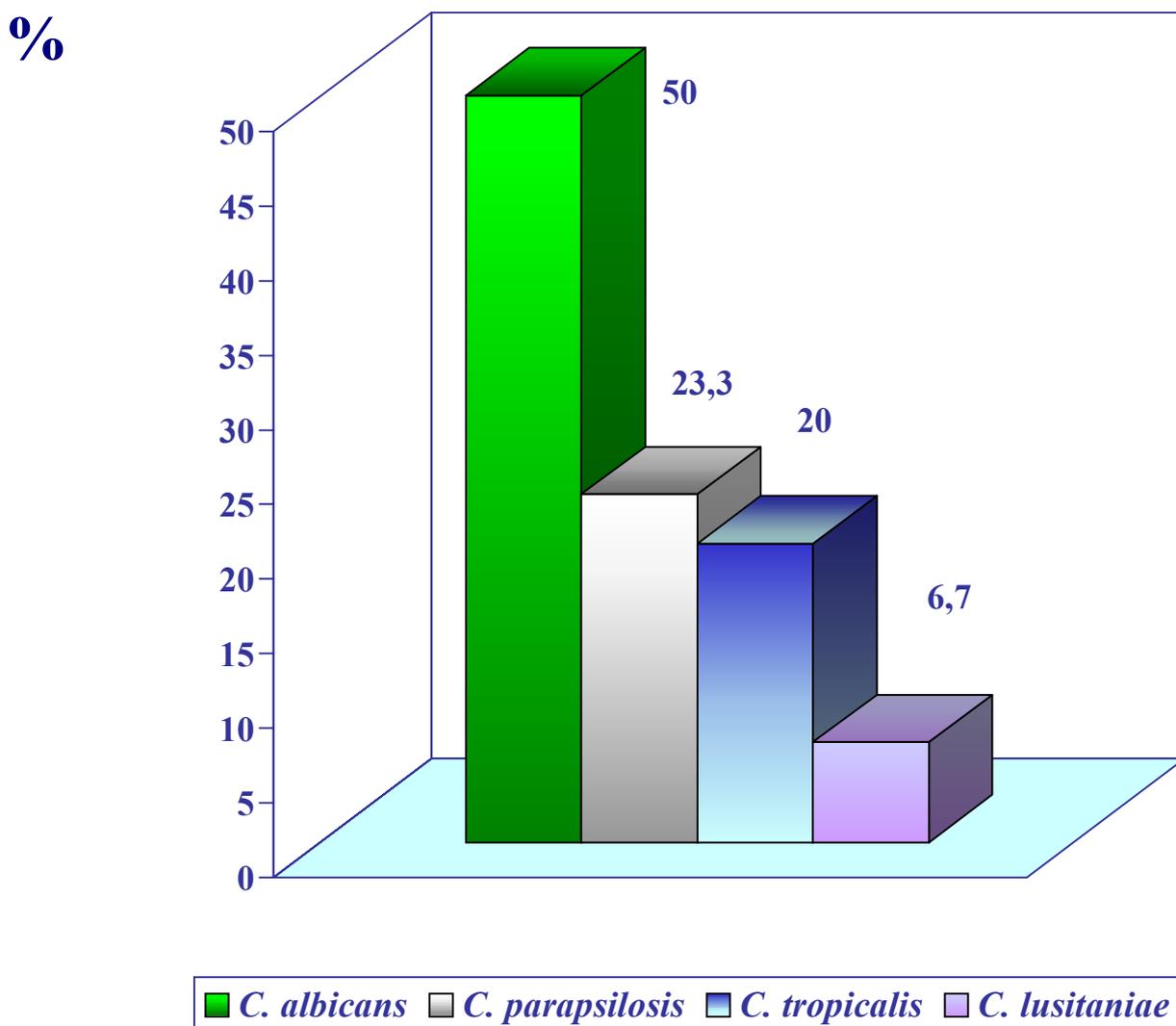
III.5.9.- AUXACOLOR®

Se han estudiado solamente 30 aislados con la técnica del Auxacolor®. La distribución de las especies identificadas se muestra en la tabla XLIII y en la figura 39. La identificación se distribuye en la proporción de 50 % *C. albicans*; 23,3 % *C. parapsilosis*; 20 % *C. tropicalis* y 6,7 % *C. lusitaniae*.

Tabla XLIII. Distribución de los aislados de levaduras con el Auxacolor®.

Identificación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Candida albicans</i>	15	50
<i>C. parapsilosis</i>	7	23,3
<i>C tropicalis</i>	6	20
<i>C. lusitaniae</i>	2	6,7
<u>Total</u>	30	100

FIGURA 39
ESPECIES DE *CANDIDA*
IDENTIFICADAS CON AUXACOLOR



III.5.10.- KRUSEI-COLOR®.

La identificación de levaduras mediante la técnica del *Krusei-color*® se realizó en sólo 12 cepas, de las cuales en 9 (75 %), que fueron anteriormente identificadas como *C. krusei* por la técnica de referencia API ID 32C, se confirmó este resultado nuevamente y las otras 3 (25 %), que no eran *C. krusei*, no aglutinaron con esta técnica (Tabla XLIV).

Tabla XLIV. Resultados de la aglutinación de la técnica de *Krusei-color*® .

Resultados	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Positivo	9	75 %
Negativo	3	25 %
<u>Total</u>	12	100

III.5.11.- SEROTIPADO DE *C. ALBICANS*.

La técnica de inmunofluorescencia se ha empleado para determinar el serotipo de los aislados de *C. albicans*. Se realizó en 95 aislados identificados previamente por el sistema API ID 32C® como *C. albicans*, de los que 84 cepas pertenecen al serotipo A (88,4 %) A y 11 cepas al tipo B (11,6 %) (Tabla XLV y figura 40).

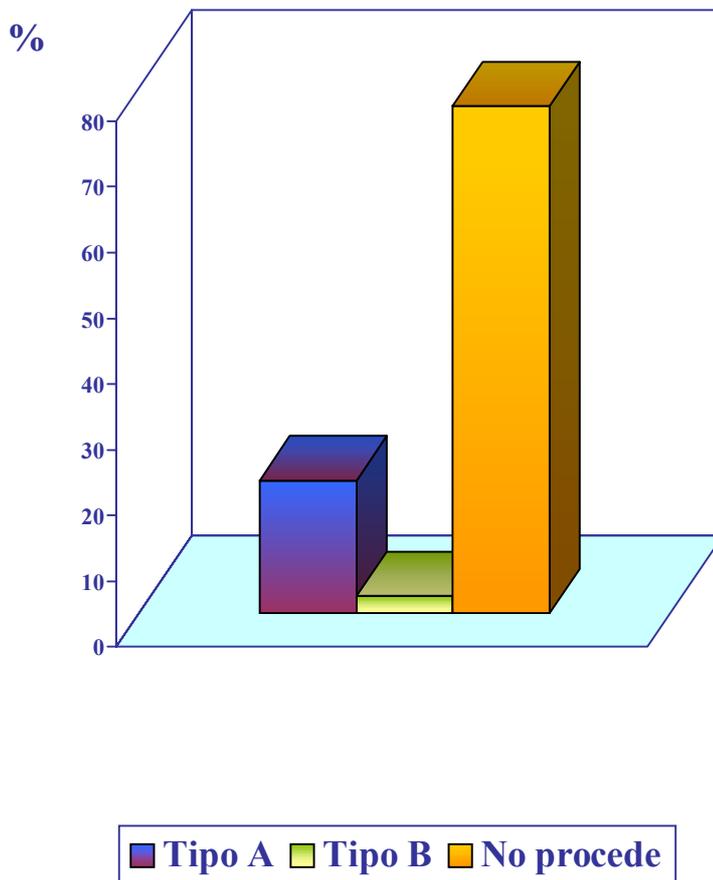
Tabla XLV. Distribución de los serotipos de *C. albicans*.

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>C. albicans</i> tipo A	84	88,4
<i>C. albicans</i> tipo B	11	11,6
<u>Total</u>	95	100

III.5.12.- DIFERENCIACIÓN DE *C. ALBICANS* Y *C. DUBLINIENSIS*.

La identificación de *C. dubliniensis* se realizó por medio de una técnica de inmunofluorescencia que permite diferenciar esta especie de *C. albicans* frente a otras técnicas incapaces de discriminar a ambas especies. De un total de 95 aislados de *C. albicans*, según el API ID 32C®, no se identificó ninguno como *C. dubliniensis*.

FIGURA 40
SEROTIPOS DE *C. ALBICANS*



III.6.- COMPARACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y EL API ID32C®.

III.6.1.- API ID 32C® - TEST DE FILAMENTACIÓN EN SUERO.

III.6.1.1.- Concordancia entre API ID 32C®-test de filamentación en suero.

El número de aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el test de filamentación resultó ser de 525, de los cuales 226 han sido identificados como *C. albicans* y 274 *C. no albicans* por ambos métodos, mientras que nos encontramos con 16 *C. albicans* cuya filamentación resultó ser negativa y 9 *C. no albicans* con resultado positivo en el test de filamentación (Tabla XLVI).

Tabla XLVI. Concordancia entre API ID 32C® y el test de filamentación.

		Test de Filamentación		Total API ID 32C®
		<i>C. no albicans</i>	<i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	16	226	242
	No <i>albicans</i>	274	9	283
	Total Filamentación	290	235	525

III.6.1.2.- Concordancia en la discriminación de otras especies clínicas más relevantes.

A.- Candida tropicalis.

De un total de 69 *C. tropicalis* identificadas, un 2,9 % dio una filamentación positiva, proporción no concordante con el API ID 32C® (Tabla XLVII).

Tabla XLVII. *C. tropicalis* identificadas con API ID 32C®-test de filamentación en suero.

	Test de filamentación		Total
	<i>C. no albicans</i>	<i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	67 (97,1 %)	2 (2,9 %)	69 (100 %)

B.- Candida parapsilosis.

De un total de 81 *C. parapsilosis* identificadas, un 4,9 % dio una filamentación positiva, proporción no concordante con el API ID 32C® (Tabla XLVIII).

Tabla XLVIII. *C. parapsilosis* identificadas con API ID 32C®-test de filamentación en suero.

	Test de filamentación		
	<i>C. no albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Total
API ID 32C®	77 (95,1 %)	4 (4,9 %)	81 (100 %)

C.- *Candida glabrata*.

De un total de 47 *C. glabrata* identificadas, un 4,3 % dio una filamentación positiva, proporción no concordante con el API ID 32C® (Tabla XLIX).

Tabla XLIX. *C. glabrata* identificadas con API ID 32C®-test de filamentación en suero.

	Test de filamentación		
	<i>C. no albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Total
API ID 32C®	45 (95,7 %)	2 (4,3 %)	47 (100 %)

III.6.2.- API ID 32C® - ALBICANS ID2®.

III.6.2.1.- Concordancia entre API ID 32C®-ID2®.

De un total de 424 aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el ID2® han sido identificados como *C. albicans* 160 y 251 *C. no albicans* por ambos métodos. 3 aislados de *C. albicans* según el API ID 32C®, no desarrollaron en ID2® la pigmentación de color verde característica de *C. albicans* y 9 *C. no albicans* sí lo hicieron (Tabla L).

Tabla L. Concordancia entre API ID 32C® y ID2® .

		ID2®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	160	3	163
	<i>C. no albicans</i>	9	251	260
	Total	169	254	424

III.6.2.2.- Concordancia en la discriminación de otras especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida tropicalis*

67 aislados identificados como *C. tropicalis* con el API ID32C® se han procesado con la técnica ID2®. El 3 % de estas *C. tropicalis* fueron identificadas como *C. albicans* con el ID2® (Tabla LI).

Tabla LI. Aislados de *C. tropicalis* identificados con el API ID32C®-*Albicans* ID2®.

	ID2®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	2 (3 %)	65 (97 %)	67 (100 %)

B.- *Candida parapsilosis*.

De 76 aislados como *C. parapsilosis* con el API ID32C®, el 3,9 % fueron identificadas como *C. albicans* con el ID2® (Tabla LII).

Tabla LII. Aislados de *C. parapsilosis* identificados con el API ID32C®-*Albicans* ID2®.

	ID2®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	3 (3,9 %)	73 (96,1 %)	76 (100 %)

C.- *Candida glabrata*

De 46 aislados identificados como *C. glabrata* con el API ID32C®, el 4,4 % fueron identificadas como *C. albicans* con el ID2® (Tabla LIII).

Tabla LIII. Aislados de *C. glabrata* identificados con el API ID32C®-*Albicans* ID2®.

	ID2®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	2 (4,4 %)	44 (95,6 %)	46 (100 %)

III.6.3.- API ID 32C® - BACTICARD-CANDIDA®

III.6.3.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Bactocard *Candida*®.

Por las técnicas API ID 32C® y Bactocard *Candida*® han sido ensayados 350 aislados, de los cuales 177 han correspondido a *C. albicans* y 146 a *C. no albicans* en las dos técnicas empleadas. No obstante, se han observado resultados dispares en 9 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C®, cuya identificación en el Bactocard *Candida*® fue de *C. no albicans* y 18 *C. no albicans* que fueron identificadas en el Bactocard *Candida*® como *C. albicans* (Tabla LIV).

Tabla LIV. Concordancia entre API ID 32C® y Bactocard *Candida*® .

		BACTICARD <i>CANDIDA</i> ®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	177	9	186
	<i>C. no albicans</i>	18	146	164
	Total	195	155	350

III.6.3.2.- Concordancia en la discriminación de otras especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida tropicalis*.

Un total de 40 *C. tropicalis* identificadas con el API ID 32C® fueron ensayadas con el Bactocard *Candida*® y resultó un 5 % como *C. albicans*, confirmándose que el 95 % no corresponde a *C. albicans* (Tabla LV).

Tabla LV. Aislados de *C. tropicalis* identificados con el API ID32C®-Bactocard *Candida*®.

	BACTICARD®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	2 (5 %)	38 (95 %)	40 (100 %)

B.- *Candida parapsilosis*.

Se han ensayado 45 aislados de *C. parapsilosis* y el 28,9 % desarrolló colonias características de *C. albicans*, el 71,1 % restante se comportó como *C. no albicans* (Tabla LVI).

Tabla LVI. Aislados de *C. parapsilosis* identificados con el API ID32C®-Bactocard *Candida*®.

	BACTICARD®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	13 (28,9 %)	32 (71,1 %)	45 (100 %)

C.- Candida glabrata

De los 21 aislados de *C. glabrata*, el 14,3 % desarrolló colonias características de *C. albicans*, el 85,7 % restante se comportó como *C. no albicans* (Tabla LVII).

Tabla LVII. Aislados de *C. glabrata* identificados con el API ID32C®-Bactocard *Candida*®.

	BACTICARD®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	3 (14,3 %)	18 (85,7 %)	21 (100 %)

III.6.4.- API ID 32C® - CHROMALBICANS®.

III.6.4.1.- Concordancia entre API ID 32C®-CHROMalbicans®.

Los aislados ensayados por el método API ID 32C® y CHROMalbicans® han sido de 346, de los cuales 159 correspondieron a *C. albicans* y 129 a *C. no albicans* por ambos métodos. Las diferencias se presentaron en 13 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C®, que no desarrollaron coloración azul en CHROMalbicans®, y 27 *C. no albicans* con desarrollo de colonias de pigmentación característica de *C. albicans* en el CHROMalbicans®. Por otro lado, no pudieron ser identificadas con precisión 18 especies en el CHROMalbicans por desarrollar colonias de pigmentación entremezclada (Tabla LVIII).

Tabla LVIII. Concordancia entre API ID 32C® y CHROMalbicans® .

		CHROMALBICANS®			Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	No <i>albicans</i> / <i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	159	13	2	174
	<i>C. no albicans</i>	27	129	16	172
	Total	186	142	18	346

III.6.4.2.- Concordancia en la discriminación de otras especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida tropicalis*

De 51 *C. tropicalis* identificadas con el API ID32C® y el CHROMalbicans®, el 9,8 % fue identificado como *C. albicans*, frente al 90,2 % que las identificó como *C. no albicans* (Tabla LIX).

Tabla LIX. Aislados de *C. tropicalis* identificados con el API ID32C®-CHROMalbicans®.

	CHROMALBICANS®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	5 (9,8 %)	46 (90,2 %)	51 (100 %)

B.- *Candida parapsilosis*.

De 45 *C. parapsilosis* identificadas con el API ID32C® y el CHROMalbicans®, el 11,1 % fue identificado como *C. albicans*, frente al 88,9 % que las identificó como *C. no albicans* (Tabla LX).

Tabla LX. Aislados de *C. parapsilosis* identificados con el API ID32C®-CHROMalbicans®.

	CHROMALBICANS®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	5 (11,1 %)	40 (88,9 %)	45 (100 %)

C.- Candida glabrata

De 24 *C. glabrata* identificadas con el API ID32C® y el CHROMalbicans®, el 16,7 % fue identificado como *C. albicans*, frente al 83,3 % que las identificó como *C. no albicans* (Tabla LXI).

Tabla LXI. Aislados de *C. glabrata* identificados con el API ID32C®-CHROMalbicans®.

	CHROMALBICANS®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	4 (16,7 %)	20 (83,3 %)	24 (100 %)

III.6.5.- API ID 32C® - CHROMAGAR-CANDIDA®.

III.6.5.1.- Concordancia entre API ID 32C®-CHROMagar *Candida*®.

De un total de 522 aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el CHROMagar *Candida*® han sido identificados como *C. albicans* 236 y 271 *C. no albicans* por ambos métodos (Tabla LXII). De estos 271 aislados se identificaron correctamente por ambos métodos 69 *C. tropicalis*, 40 *C. glabrata*, 6 *C. krusei* y 74 *C. parapsilosis*.

Tabla LXII. Concordancia entre API ID 32C® y CHROMagar *Candida*® .

		CHROMAGAR <i>CANDIDA</i> ®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	236	6	242
	<i>C. no albicans</i>	9	271	280
	Total	245	277	522

Tabla LXIII. Total de aislados identificados con el API ID 32C®-CHROMagar *Candida*®.

III.6.5.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- Candida albicans.

Han sido ensayadas 242 *C. albicans* identificadas con el API ID32C®, de las cuales 236 (97,5 %) coincidieron en la identificación con el CHROMagar *Candida*®, mientras que hubo discrepancias en 6 (2,5 %). De estas, 3 desarrollaron una coloración azul, típica de *C. tropicalis*; 1 presentó coloración blanca, otra un color blanco-gris y otra una tonalidad marrón (Tabla LXIV).

Tabla LXIV. Aislados de *C. albicans*.

	CHROMagar <i>Candida</i> ®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	236 (97,5 %)	6 (2,5 %)	242 (100 %)

B.- Candida tropicalis.

Han sido ensayadas 71 *C. tropicalis*, identificadas con el API ID32C®, con el CHROMagar *Candida*®, coincidiendo en la identificación en el 97,2 % (69 aislados). Hubo discrepancias en el 2,8 % (2 aislados), que desarrollaron colonias características de *C. albicans* (Tabla LXV).

Tabla LXV. Aislados de *C. tropicalis*

	CHROMagar <i>Candida</i> ®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. no tropicalis</i>	
API ID 32C®	69 (97,2 %)	2 (2,8 %)	71 (100 %)

C.- *Candida parapsilosis*.

De los 78 aislados identificados como *C. parapsilosis* con el API ID32C® y ensayados con el CHROMagar *Candida*®, coincidieron en ambas técnicas en el 94,9 % en la identificación de *C. parapsilosis*. Se detectaron discrepancias en 4 aislados (5,1 %). En 3 casos se observó la coloración verde característica de *C. albicans* y otro caso desarrolló un color blanco-violeta en el CHROMagar *Candida*® (Tabla LXVI).

Tabla LXVI. Aislados de *C. parapsilosis*

	CHROMagar <i>Candida</i> ®		Total
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. no parapsilosis</i>	
API ID 32C®	74 (94,9 %)	4 (5,1 %)	71 (100 %)

D.- Candida glabrata.

Han sido ensayadas 48 *C. glabrata* identificadas con el API ID32C®, de las cuales 40 (83,3 %) coincidieron en la identificación con el CHROMagar *Candida*®, mientras que hubo discrepancias en 8 (16,7 %). De estas, 3 desarrollaron colonias de color azul (características de *C. tropicalis*), 1 presentó colonias de color blanco, otra colonias de color rosa y otra colonias de color verde (características de *C. albicans*) (Tabla LXVII).

Tabla LXVII. Aislados de *C. glabrata*.

	CHROMagar <i>Candida</i> ®		Total
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. no glabrata</i>	
API ID 32C®	40 (93,3 %)	8 (16,7 %)	48 (100 %)

E.- Candida krusei.

Han sido identificadas 7 aislados con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, existiendo una concordancia del 85,7 % entre ellas. Uno de los aislados desarrolló colonias con pigmentación correspondiente a *C. tropicalis* (tabla LXVIII).

Tabla LXVIII. Aislados de *C. krusei*

	CHROMagar <i>Candida</i> ®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	
API ID 32C®	1 (14,3 %)	6 (85,7 %)	7 (100 %)

III.6.6.- API ID 32C® - MICROSCAN RAPID YEAST IDENTIFICATION®.

III.6.6.1.- Concordancia entre API ID 32C®-MicroScan Rapid Yeast Identification®.

De un total de 181 aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el MicroScan® han sido identificados como *C. albicans* 55 y 112 *C. no albicans* por ambos métodos. En la identificación no han coincidido 4 *C. albicans* según el API ID 32C®, cuya identificación en el MicroScan® resultó ser *C. no albicans* y 9 *C. no albicans* que fueron identificadas en el MicroScan® como *C. albicans* (Tabla LXIX).

Tabla LXIX. Concordancia entre API ID 32C® y MicroScan® .

		MICROSCAN®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	55	4	59
	<i>C. no albicans</i>	9	112	121
	Total	64	116	181

III.6.6.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- Candida albicans.

Con el API ID32C® han sido identificadas 59 *C. albicans*, de las cuales el 93,2 % fueron coincidentes en la identificación obtenida con el MicroScan®. El 6,8 % restante (4 aislados) fueron identificados como *C. tropicalis* (Tabla LXXI).

Tabla LXXI. Aislados de *C. albicans*

	MicroScan®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	4 (6,8 %)	55 (93,2 %)	59 (100 %)

B.- Candida tropicalis

De 28 *C. tropicalis* identificados con el API ID32C® y ensayados por esta técnica el 96,4 % fueron coincidentes en el resultado. Sólo un caso se identificó como *C. albicans* por el MicroScan® (Tabla LXXII).

Tabla LXXII. Aislados de *C. tropicalis*

	MicroScan®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	27 (96,4 %)	1 (3,6 %)	28 (100 %)

C.- Candida parapsilosis.

34 *C. parapsilosis* identificadas por el API ID32C® y ensayadas por el MicroScan®, el 85,3 % fueron identificadas correctamente. En 5 aislados (14,7 %) se obtuvieron discrepancias, identificándose 3 como *C. albicans*, uno como *C. catenulata* y otro como *C. krusei*. (Tabla LXXIII).

Tabla LXXIII. Aislados de *C. parapsilosis*

	MicroScan®		Total
	<i>C. no parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
API ID 32C®	5 (14,7 %)	29 (85,3 %)	34 (100 %)

D.- Candida glabrata

Con el API ID32C® han sido identificadas 17 *C. glabrata*, que fueron procesadas con el MicroScan®, apreciándose que un 76,5 % de las mismas han coincidido en el resultado. Un 23,5 % fueron identificados como otras especies diferentes a *C. glabrata* por el MicroScan®, encontrando 2 *C. albicans*, 1 *C. ater* y una *C. tropicalis* (Tabla LXXIV).

Tabla LXXIV. Aislados de *C. glabrata*

	MicroScan®		Total
	<i>C. no glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	
API ID 32C®	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)	17 (100 %)

III.6.7.- API ID 32C® - VITEK YEAST BIOCHEMICAL CARD®.

III.6.7.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Vitek Yeast Biochemical Card®.

Los aislados identificados por API ID 32C® y testados con el Vitek® han sido un total de 158, de los cuales 41 (93,2 %) han coincidido en la identificación por ambos métodos como *C. albicans* y 110 *C. no albicans*. Las diferencias se han encontrado en 3 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C®, cuya identificación en el Vitek® fue de *C. no albicans* y 4 *C. no albicans* que fueron identificadas en el Vitek® como *C. albicans* (Tabla LXXV).

Tabla LXXV.- Concordancia entre API ID 32C® y Vitek® .

		VITEK®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	41	3	44
	<i>C. no albicans</i>	4	110	114
	Total	45	113	158

Tabla LXXVI. Total de aislados identificados con el API ID 32C®-Vitek®.

	Bla. cap	C. alb	C. fam	C. glab	C. glab	C. guill	C. hum	Vitek		C. trop	C. zeyl	Cr. laur	Cr. neof	P. ohm	Proth. spp.	S. cer	T. beig	Total
								C. kr	C. lusit									
C. alb		40								4								44
C. fam						1				1								6
C. glab		1		12						1								14
C. glob														1				1
C. guill			2			1												4
C. inc								1										1
C. int														1				2
C. kr		1						2										3
C. lusit		1							16					1				18
C. mel									1									1
C. par		1							2	23				2				28
C. trop										1	17				1			19
Cr. laur							1			1	1							4
Cr. neof										1	1		1					2
P. etch										2	1							3
R. rubra										1								1
S. cer											1					1		2
T. cap	1																	1
T. cut							2										1	3
Zygos.														1				1
Total	1	44	2	12	2	3	3	3	19	34	26	1	1	6	1	1	1	158

C. alb, *Candida albicans*; fam, *famata*; glab, *glabrata*; glob, *globosa*; guill, *guilliermondii*; hum, *humicola*; inc, *inconspicua*; int, *intermedia*; kr, *krusei*; lusit, *lusitanae*; mel, *melibiosica*; par, *parapsilosis*; trop, *tropicalis*; zeyl, *zeylanoides*; Cr. neof, *Cryptococcus neoformans*; Proth. spp, *Prothoteca* spp; P.ohm., *Pichia ohmeri*; S. cerevisiae, *Saccharomyces cerevisiae*; T. beig, *Trichosporon beigeli*; laur, *laurentii*; P. etch, *Prothoteca etchell/carsonii*; cap, *capitatum*; cut, *cutaneum*; Zygos, *Zigosaccharomyces*

III.6.7.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- Candida albicans.

Del total de 44 *C. albicans* identificadas con el API ID 32C® concordaron en un 90,9 % cuando se identificaron también con el Vitek®. 4 aislados fueron identificados por este método como *C. tropicalis* (Tabla LXXVII).

Tabla LXXVII. Aislados de *C. albicans*.

	Vitek®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	
API ID 32C®	4 (9,1 %)	40 (90,9 %)	44 (100 %)

B.- Candida tropicalis

De 19 aislados identificados como *C. tropicalis* con el API ID 32C®, el 88,5 % fueron igualmente identificados con el Vitek®, habiendo discrepancias en un 10,5 % (2 aislados), correspondiendo uno a *C. parapsilosis* y otro a *Prothoteca* spp. (Tabla LXXVIII).

Tabla LXXVIII. Aislados de *C. tropicalis*

	Vitek®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. no tropicalis</i>	
API ID 32C®	17 (88,5 %)	2 (10,5 %)	19 (100 %)

C.- Candida parapsilosis.

De 28 aislados identificados como *C. parapsilosis* con el API ID 32C®, el 82,1 % fueron correctamente identificados con el Vitek®. Hubo discrepancias en 5 aislados (17,9 %), 2 identificados como *C. lusitaniae*, otros 2 como *P. ohmeri* y otro como *C. albicans* (Tabla LXXIX).

Tabla LXXIX. Aislados de *C. parapsilosis*.

	Vitek®		Total
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. no parapsilosis</i>	
API ID 32C®	23 (82,1 %)	5 (17,9 %)	28 (100 %)

D.- Candida glabrata

De 14 aislados identificados como *C. glabrata* con el API ID 32C®, el 85,7 % fueron también identificados correctamente con el Vitek®. Sólo 2 aislados (14,3 %) discreparon en la identificación, que correspondió a 1 *C. albicans* y a 1 *C. tropicalis* (Tabla LXXX).

Tabla LXXX. Aislados de *C. glabrata*.

	Vitek®		Total
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. no glabrata</i>	
API ID 32C®	12 (85,7 %)	2 (14,3 %)	14 (100 %)

III.6.8.- API ID 32C® - RAPID YEAST PLUS SYSTEM®.

III.6.8.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Rapid Yeast Plus System®.

Un total de 107 aislados han sido identificados por el método API ID 32C® y por el RapID Yeast Plus System®, coincidiendo en el resultado de la identificación 50 aislados de *C. albicans* y 49 de *C. no albicans* por ambos métodos. Existiendo discrepancias en el resultado de 5 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C® y *C. no albicans* con el método RapID Yeast Plus System y 3 *C. no albicans* que fueron identificadas con el RapID Yeast Plus System® como *C. albicans* (Tabla LXXXI).

Tabla LXXXI. Concordancia entre API ID 32C® y RapID Yeast Plus System® .

		RAPID YEAST PLUS SYSTEM®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	50	5	55
	<i>C. no albicans</i>	3	49	52
	Total	53	54	107

III.6.8.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- Candida albicans.

Del total de 55 *C. albicans* identificadas con el API ID 32C® concordaron en un 90,9 % al identificarse con el RapID Yeast Plus System®. Los restantes 5 aislados (9,1 %) fueron identificadas uno como *C. tropicalis*, otro como *C. parapsilosis*, otro como *Yar. lipolytica* y dos como no identificados (Tabla LXXXIII).

Tabla LXXXIII. Aislados de *C. albicans*.

	RapID Yeast Plus System®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	50 (90,9 %)	5 (9,1 %)	55 (100 %)

B.- Candida tropicalis

El 100 % de las identificaciones de *C. tropicalis* coincidieron al realizar el API ID 32C® y el RapID Yeast Plus System® (Tabla LXXXIV).

Tabla LXXXIV. Aislados de *C. tropicalis*.

	RapID Yeast Plus System®		Total
	<i>C. tropicalis</i>		
API ID 32C®	11 (100 %)		11 (100 %)

C.- *Candida parapsilosis*.

Identificados 11 aislados de *C. parapsilosis* con la técnica del RapID Yeast Plus System® nos encontramos un grado de concordancia entre esta técnica y el API ID 32C® del 81,8 %, identificándose el resto como *C. albicans* (Tabla LXXXV).

Tabla LXXXV. Aislados de *C. parapsilosis*.

	RapID Yeast Plus System®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
API ID 32C®	2 (18,2 %)	9 (81,8 %)	11 (100 %)

D.- *Candida glabrata*.

La identificación de un solo aislado de *C. glabrata* fue coincidente con el resultado de la identificación realizada con el RapID Yeast Plus System® (Tabla LXXXVI).

Tabla LXXXVI. Aislados de *C. glabrata*.

	RapID Yeast Plus System®	Total
	<i>C. glabrata</i>	
API ID 32C®	1 (100 %)	1 (100 %)

III.6.9.- API ID 32C® - AUXACOLOR®.

III.6.9.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Auxacolor®.

De un total de 30 aislados identificados por API ID 32C® y el Auxacolor®, 15 han coincidido en la identificación por ambos métodos como *C. albicans* y 14 *C. no albicans*, existiendo tan solo un aislado cuya identificación difería, identificándose como *C. albicans* según el API ID 32C® y por el Auxacolor® se identificó como *C. no albicans* (Tabla LXXXVII).

Tabla LXXXVII.- Concordancia entre API ID 32C® y Auxacolor®.

		AUXACOLOR®		Total
		<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>	
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	15	1	16
	<i>C. no albicans</i>		14	14
	Total	15	15	30

En la tabla LXXXVIII se recoge la distribución de las especies identificadas con el API ID 32C® y el Auxacolor®.

Tabla LXXXVIII. Total de aislados identificados
con el API ID 32C® y el Auxacolor®.

AUXACOLOR®						
		<i>C. albicans</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<u>Total</u>
API ID 32C®	<i>C. albicans</i>	15			1	16
	<i>C. lusitaniae</i>		2			2
	<i>C. parapsilosis</i>			6		6
	<i>C. tropicalis</i>			1	4	5
	<i>Cr. laurentii</i>				1	1
	<u>Total</u>	15	2	7	6	30

III.6.9.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- Candida albicans.

De los 16 aislados identificados, el grado de concordancia entre ambas técnicas fue del 93,7 %. Sólo un aislado fue identificado como *C. tropicalis* (Tabla LXXXIX).

Tabla LXXXIX. Aislados de *C. albicans*.

	Auxacolor®		Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	
API ID 32C®	15 (93,7 %)	1 (6,3 %)	16 (100 %)

B.- Candida tropicalis

De los 5 aislados identificados, el grado de concordancia entre ambas técnicas fue del 80 %. Un aislado fue identificado como *C. parapsilosis* (Tabla XC).

Tabla XC. Aislados de *C. tropicalis*.

	Auxacolor®		Total
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
API ID 32C®	4 (80 %)	1 (20 %)	5 (100 %)

C.- *Candida parapsilosis*.

Los 6 aislados de *C. parapsilosis* fueron correctamente identificados por el Auxacolor® (Tabla XCI).

Tabla XCI. Aislados de *C. parapsilosis*.

	Auxacolor®	Total
	<i>C. parapsilosis</i>	
API ID 32C®	6 (100 %)	6 (100 %)

III.7.- PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y TIEMPOS VARIABLES.

En la figura 41 se muestra el crecimiento de 516 aislados de levaduras a 30 °C a intervalos de 24 horas. El 89,5 % de los aislados se han desarrollado a una temperatura de incubación de 30 °C tras un período de 24 horas, frente al 10,5 % que necesitaron un período de incubación mayor. A las 48 horas de incubación se aprecia un crecimiento del 97,3 % y efectuada la lectura a las 72 h. se observa un crecimiento del 97,7 % (Tabla XCII).

En la figura 42 se representa el porcentaje de crecimiento de los aislados (91,1 %) a 37 °C tras las primeras 24 horas de incubación, frente al 8,9 % de aislados que necesitaron más tiempo de incubación. A las 48 horas se produjo un incremento del 5,6 en el porcentaje de crecimiento y sólo un 3,3 % no crecieron en este período. A las 72 h. el porcentaje de crecimiento no varía notablemente (97,3 %), sólo un 2,7 % de las cepas sembradas no crecieron (Tabla XCIII).

En la figura 43 se observan los porcentajes de crecimiento a 42 °C en los diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h.). El porcentaje de especies que crecieron fue del 69,8 % a las 24 h., del 78,5 % a las 48 h. y del 81,6 % a las 72 horas (Tabla XCIV).

En las figuras 44, 45 y 46 se muestran el crecimiento de los aislados teniendo en cuenta los intervalos de tiempo a temperatura variable.

Tabla XCII. Crecimiento a 30°C y tiempos variables.

	Tiempos		
	24H	48H	72H
Crece	89,5 %	97,3 %	97,7 %
No crece	10,5 %	2,7 %	2,3 %

Tabla XCIII. Crecimiento a 37°C y tiempos variables.

	Tiempos		
	24H	48H	72H
Crece	91,1 %	96,7 %	97,3 %
No crece	8,9 %	3,3 %	2,7 %

Tabla XCIV. Crecimiento a 42 °C y tiempos variables.

	Tiempos		
	24H	48H	72H
Crece	69,8 %	78,5 %	81,6 %
No crece	30,2 %	21,5 %	18,4 %

FIGURA 41
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 30 °C A TIEMPO VARIABLE

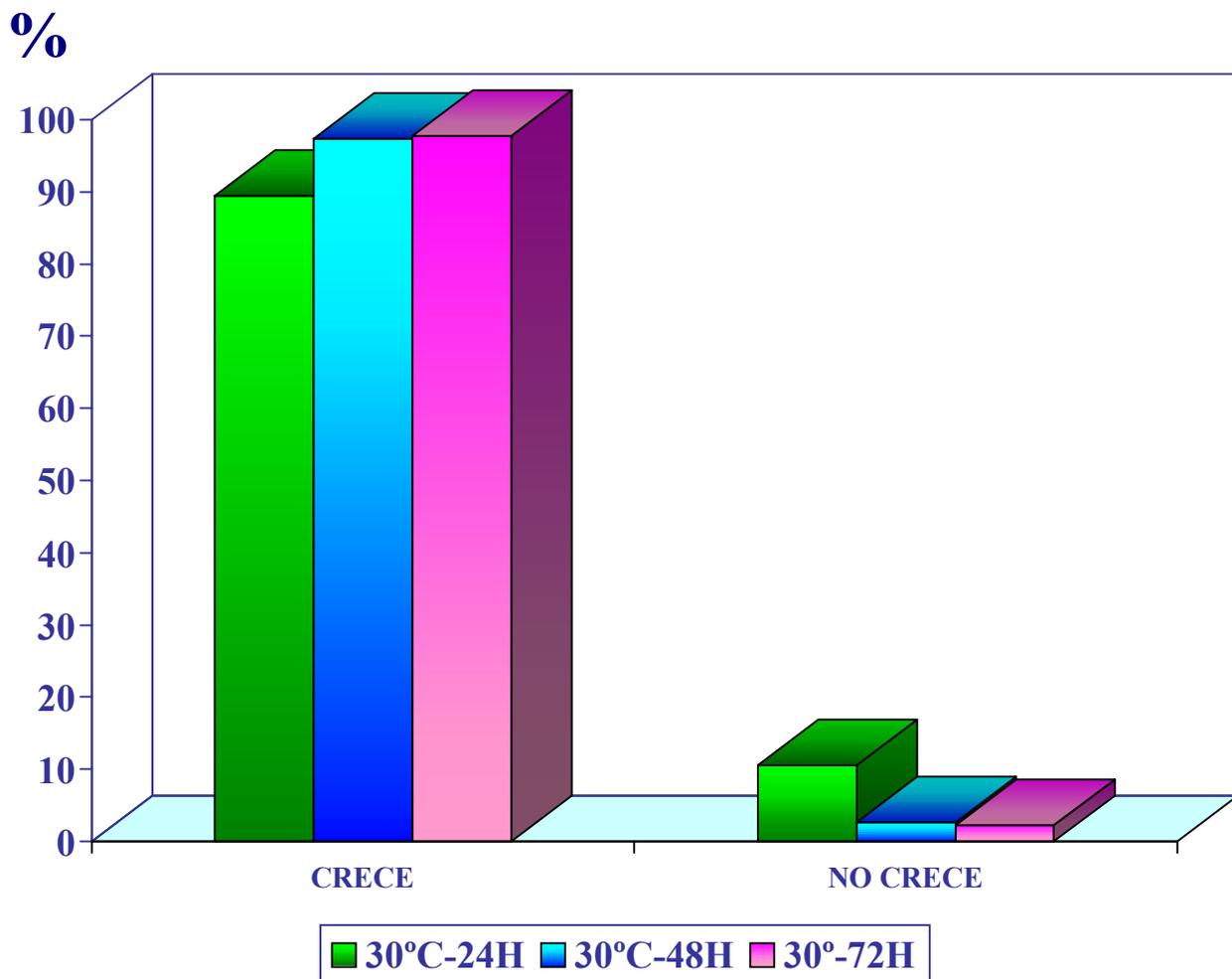


FIGURA 42
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 37 °C A TIEMPO VARIABLE

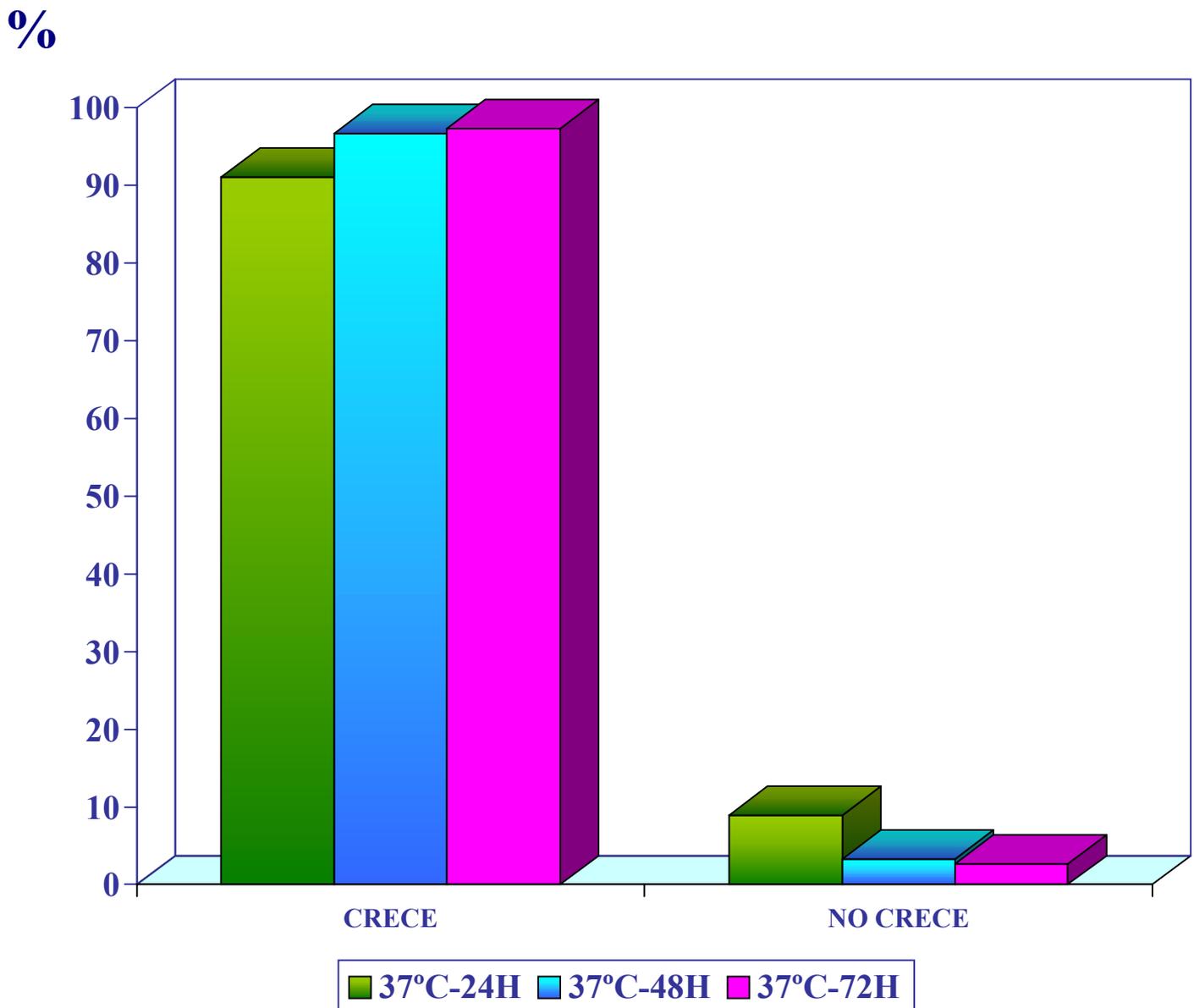


FIGURA 43
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 42 °C A TIEMPO VARIABLE

%

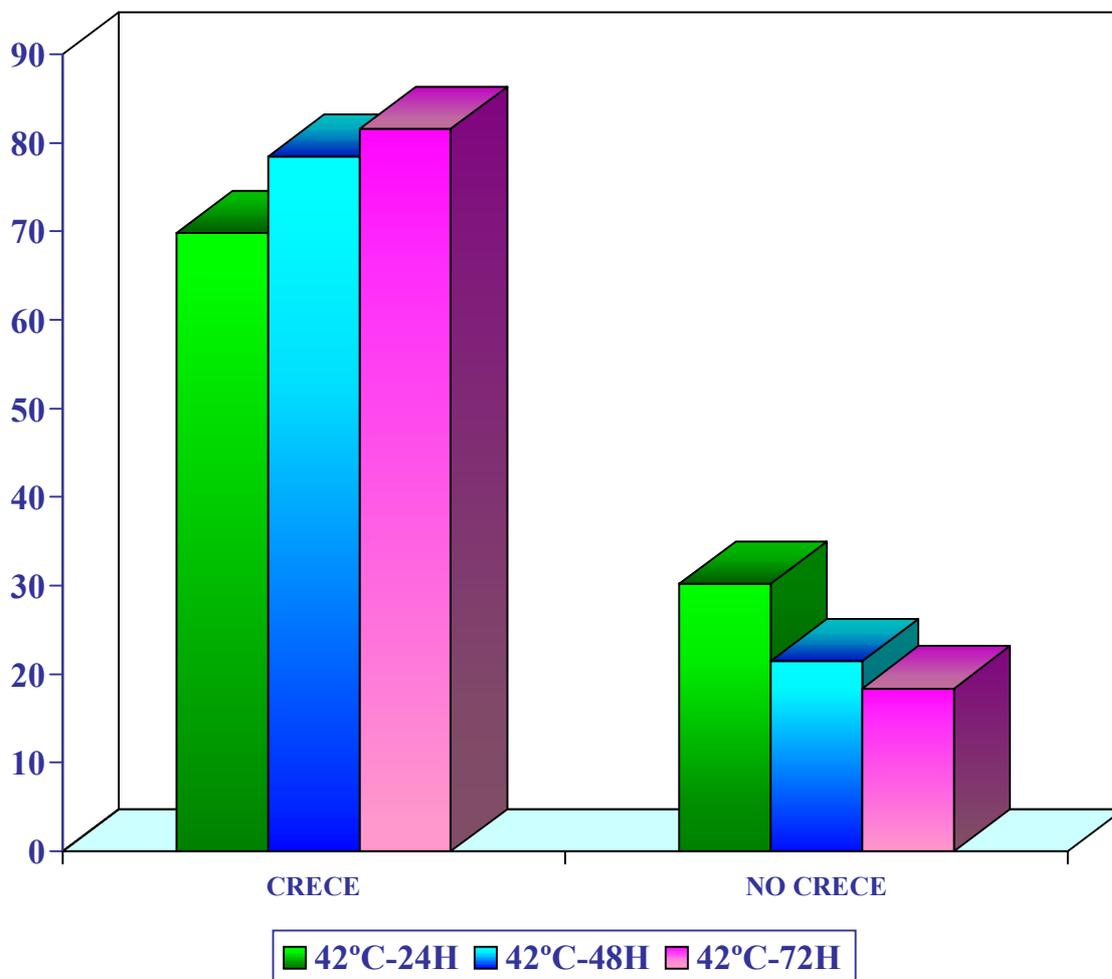


FIGURA 44
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 24 H A TEMPERATURA VARIABLE

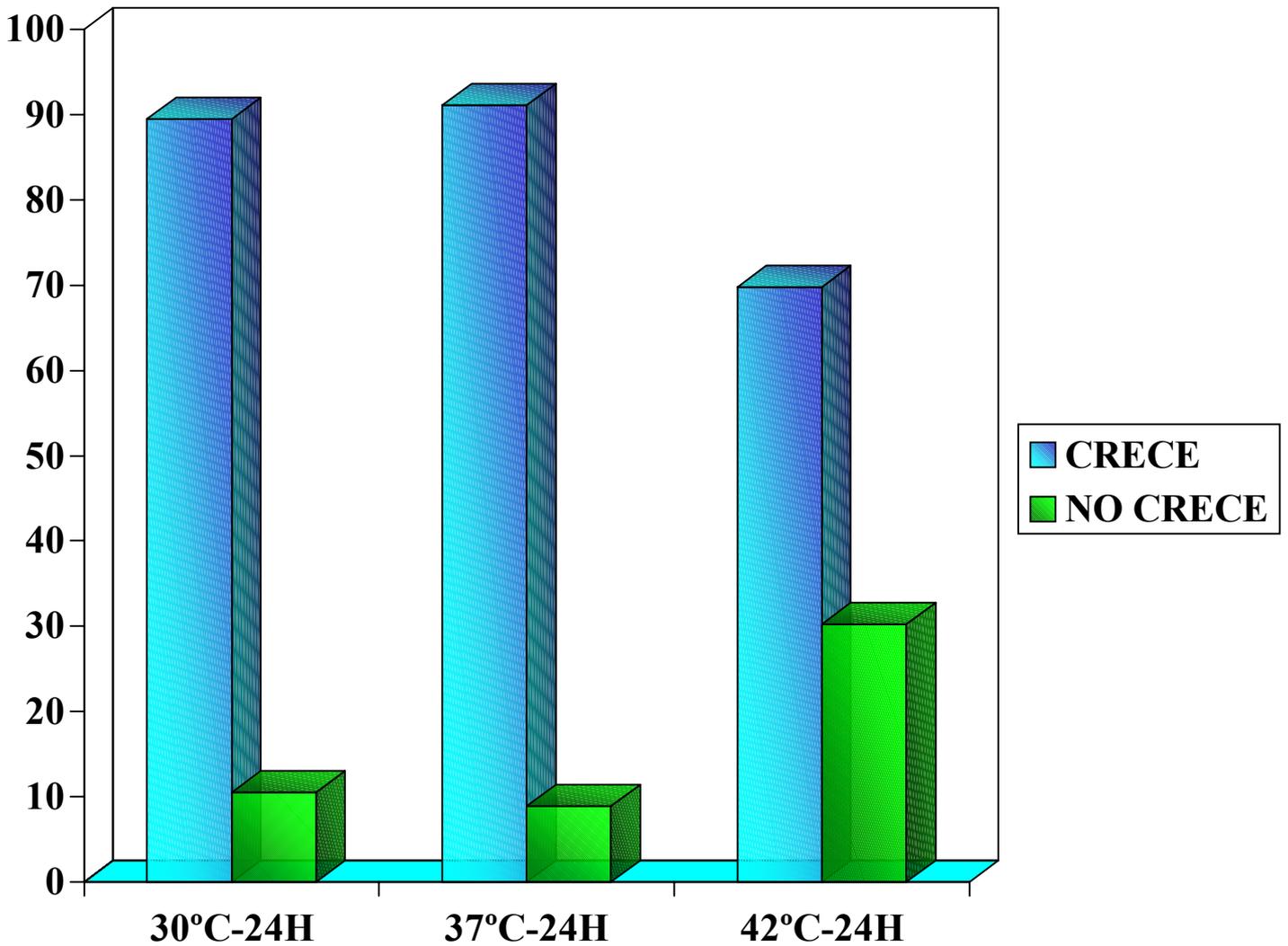


FIGURA 45
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 48 H A TEMPERATURA VARIABLE

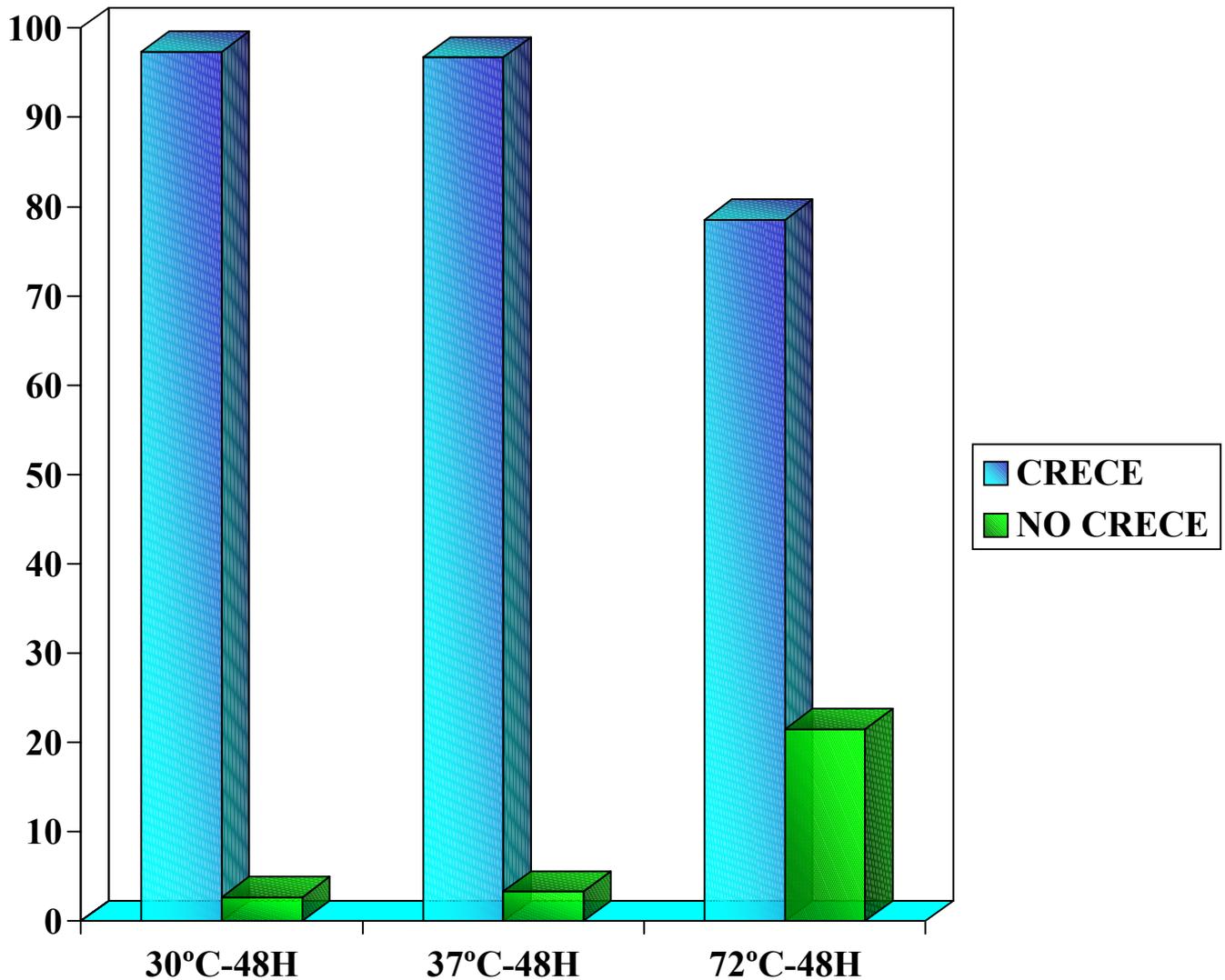
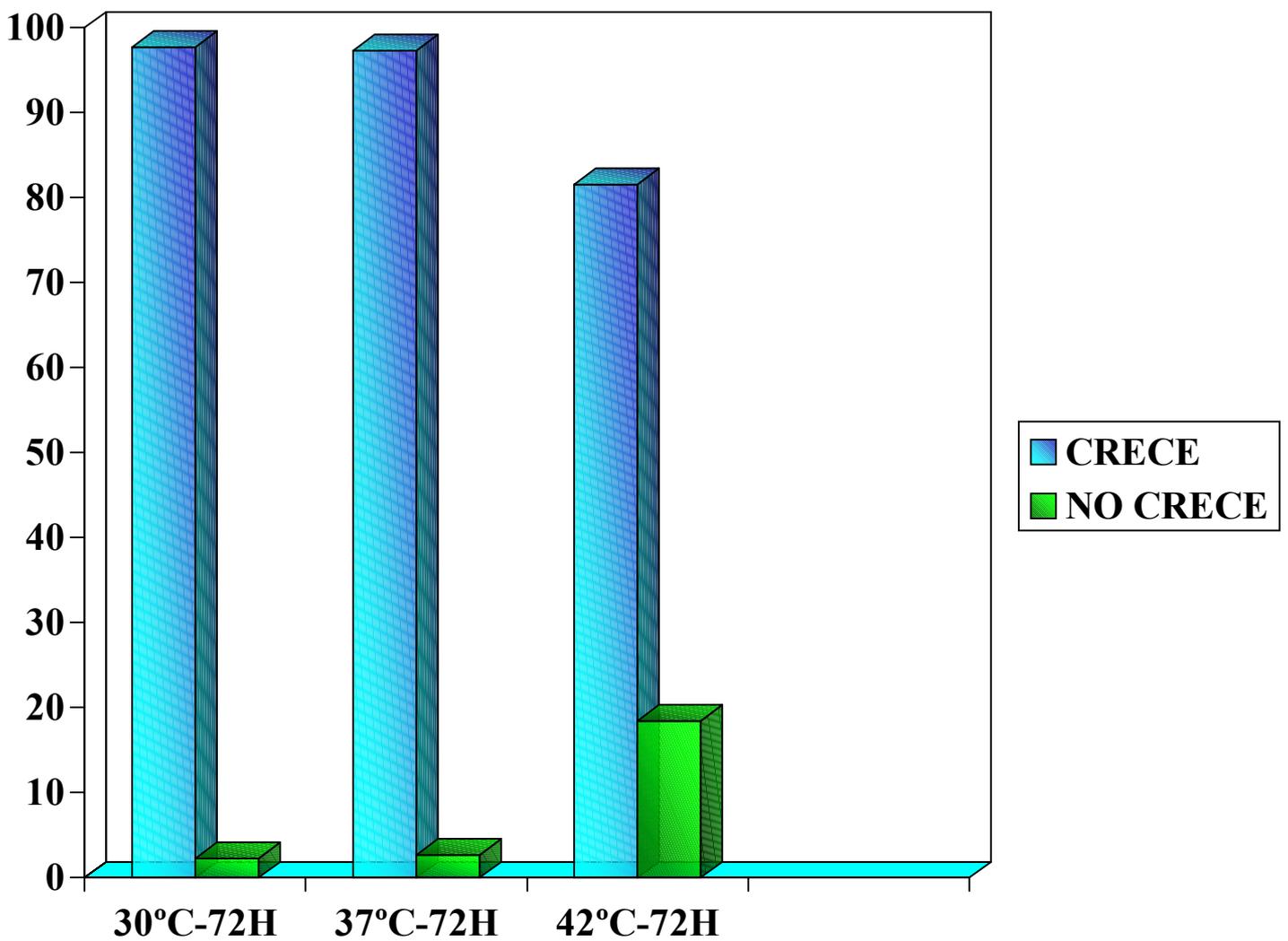


FIGURA 46
CRECIMIENTO DE LOS AISLADOS DE LEVADURA
A 72 H A TEMPERATURA VARIABLE



IV.- DISCUSIÓN.

En los recientes años, la incidencia de infecciones serias causadas por levaduras ha incrementado significativamente, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Horn y cols., 1985; Walsh y Pizzo, 1988; Banerjee y cols., 1991). Esto ha dado lugar a fuertes presiones de los laboratorios clínicos para asegurar la identificación a nivel de especie de una gran variedad de levaduras médicamente importantes (McGowan y Mortensen, 1993). Por ello se ha hecho necesario el desarrollo de métodos rápidos y seguros designados para el uso en laboratorios de diagnóstico para la identificación de levaduras, no sólo para conocer el agente etiológico de la infección, sino la necesidad de instaurar el tratamiento antifúngico más adecuado.

El uso de los sistemas de identificación rápidos requiere entrenamiento y familiarización suficiente con cada una de las pruebas realizadas para posibilitar interpretaciones. Antes de decidir el empleo de cada uno de estos sistemas en un laboratorio, deben tomarse en cuenta factores como el coste, estabilidad y adaptabilidad a las necesidades individuales de cada laboratorio (Koneman y cols., 1999). La introducción de los sistemas comerciales para la identificación de las levaduras patógenas ha favorecido mucho la rapidez y la facilidad de identificación en los laboratorios clínicos de rutina. Estas pruebas comerciales están estandarizadas y tecnológicamente son adaptables a los laboratorios más pequeños, pudiendo conseguirse excelentes resultados empleando algunos de estos sistemas. Además, la disponibilidad de la base de datos permite el examen de cientos de variantes y biotipos (Gray y Roberts, 1988). Algunos métodos comerciales ofrecen una alta exactitud de identificación en comparación con los métodos tradicionales de identificación.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.1.- LEVADURAS ENSAYADAS.

Un total de 537 levaduras aisladas de muestras clínicas fueron ensayadas en nuestro estudio. En general, se observa que, independientemente de la procedencia orgánica de la muestra estudiada, *C. albicans* (46,6 %) ocupa la primera posición, a gran distancia de las demás especies, en cuanto a frecuencia de aislamientos. Así le siguen *C. parapsilosis* (14,6 %), *C. tropicalis* (13,3 %), *C. glabrata* (9,2 %) y *C. lusitaniae* (3,7 %). El resto de especies del género *Candida* de importancia clínica se han identificado en una proporción bastante inferior, así *C. famata* (1,7 %), con un 1,5 % *C. guilliermondii* y *C. krusei*; *C. inconspicua*, *C. intermedia* y *C. meliobiosica* con un 0,4 % y *C. globosa*, *C. humicola* y *C. norvengensis* con un 0,2.

Estos resultados han sido comparados con los obtenidos en nuestro propio laboratorio por Arévalo, en 1989, que en su trabajo encuentra que es también *C. albicans* (78,7 %) la especie más aislada, pero le siguen según la frecuencia de aislamiento *C. tropicalis* (8,1 %), *C. parapsilosis* (5,4 %) y *C. glabrata* (5,3 %). Puede observarse que en un período de 10 años se ha visto disminuida la frecuencia en el aislamiento de *C. albicans*, frente al progresivo aumento de las restantes especies, así como un cambio en la distribución de las especies aisladas.

Ng y cols., (1998-1999), coincidentes con nuestra serie, en su estudio de varias muestras clínicas encontraron como las especies más prevalentes a *C. albicans* (44,2%), *C. parapsilosis* (26,0%), *C. tropicalis* (17,7%) y *C. glabrata* (9,6 %).

El estudio realizado por Pereiro y cols., (1994) sobre candidiasis en el Servicio de Dermatología del Hospital General de Galicia-Gil Casares muestra como entre las especies más predominantes a *C. albicans* (35,6 %), *C. parapsilosis* (6 %), *C. guilliermondii* (5,9 %) y *C. famata* (4,5 %), diferenciándose en la distribución obtenida en nuestro estudio y que concuerdan con un estudio de micosis realizado en el área sanitaria de Asturias por Alvarez y cols., (1994), donde también encontraron como especies aisladas con más frecuencia a *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.2.- ORIGEN ORGÁNICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO CANDIDA Y OTRAS LEVADURAS.

Las muestras estudiadas correspondieron en su mayor parte muestras tipo vaginal (22,3 %), seguidas de los urinocultivos (19,4 %), uñas (15,7 %), hemocultivo (11,8 %), exudado de herida (7,8 %), coprocultivo (5,2 %), catéteres (4,5 %) y muestras respiratorias (4,3 %). El resto, 8,8 %, engloba a otras muestras de diferentes procedencias orgánicas. También, Arévalo, en su estudio de 1989, recoge los exudados vaginales en primera posición (50 %), siguiéndole las muestras broncopulmonares (14,3 %), muestras de piel y anejos, casi exclusivamente uñas, (13,3 %); orinas (11,2 %), muestras orofaríngeas (5,7 %) y hemocultivos (1,7 %).

En este apartado comentaremos las muestras de las que procedían un mayor número de aislados, así como aquellas de origen orgánico más relevante.

IV.2.1.- AISLADOS DE LEVADURAS DE LOCALIZACIÓN VAGINAL.

Observamos que las especies aisladas con mayor frecuencia en las muestras vaginales fueron *C. albicans* (61,1 %), *C. glabrata* (16,7 %), *C. parapsilosis* (12 %), y *C. krusei* (3,7 %), aislándose otras especies en proporciones inferiores al 3,5 %. Estos datos se aproximan a los de Sobel y Chaim (1996), quienes en un estudio de 24 pacientes con candidiasis vaginal encontraron a *C. albicans* como la especie mayoritaria (92 %), siguiéndole *C. parapsilosis* (8 %). Los trabajos de Odds (1988), Arévalo (1989), Goldstein (1993), Sobel (1993), Tietz y cols., (1995), Houang y cols., (1997) y Kwok y cols., (1998), presentan resultados que concuerdan con los obtenidos por nosotros, siendo *C. albicans* la especie más aislada, *C. glabrata* y *C. tropicalis* las que ocupan el segundo y tercer lugar, respectivamente. Esta última no se aisló en ninguna de nuestras muestras, como se refleja en la tabla XCV.

Un estudio sobre candidiasis vaginal en prostitutas, de Otero y cols., (1998), muestra como *C. albicans* sigue siendo la especie más aislada (89,3 %), porcentaje mucho más alto que el encontrado por nosotros, siguiéndole *C. glabrata* (2,7 %), *C. parapsilosis* (1,2 %), *S. cerevisiae* (0,4 %), siendo estas proporciones mucho menores que las halladas en nuestro medio, cabe destacar, el aislamiento de *S. cerevisiae* (Tabla XCV).

Ng y cols., (1998-1999) presentan en su trabajo una distribución diferente de las especies más importantes aisladas en muestras vaginales: *C. albicans* (44.2%), *C. parapsilosis* (26.0%), *C. tropicalis* (17.7%), *C. glabrata* (9.6%). Como también ocurre con el trabajo de Giudice y cols., (1994), que encuentran como las especies predominantes en muestras de secreción vaginal a *C. albicans* (85,5 %), *C. tropicalis* (7,8 %), *C. guilliermondii* (5,5 %) y *C. krusei* (1,2 %).

Tabla XCV. Comparación de aislados en muestras vaginales con otros autores.

Autores	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Odds (1988)	84,2	5,5	5,3	1,2
Arévalo (1989)	89,3	6	2,3	1,6
Giudice y cols., (1994)	85,5	-	7,8	-
Tietz y cols., (1995)	62,4	10,6	-	3,5
Kwok y cols., (1998)	58	32	6	4
Otero y cols., (1998)	89,3	2,7	-	1,2
Ng y cols., (1998-1999)	44,2	9,6	17,7	26
Al-Rawi y Kavanagh (1999)	92,9	3,6	3,5	-
Nuestros datos (2000)	61,1	16,7	-	12

IV.2.2.- AISLADOS DE LEVADURAS EN ORINA.

En las muestras de orina se aislaron como especies predominantes *C. albicans* (53,2 %), *C. tropicalis* (22,3 %), *C. parapsilosis* (10,6 %) y *C. glabrata* (10,6 %), entre otras; muy semejante a la relación encontrada por Arévalo (1989) y Chen y cols., (1997), frente a otros trabajos donde las levaduras más comúnmente encontradas fueron *C. albicans* y *C. glabrata* (Odds, 1988; Jacobs, 1996; Jacobs y cols., 1996; Hazen y cols., 1999) (Tabla XCVI).

Mirdha y cols., (1998) encontraron también en su trabajo como las especies más aisladas *C. albicans* y *C. tropicalis*, siguiéndole en tercer lugar *C. krusei*.

Pero no siempre es *C. albicans* el agente patógeno más aislado, como así hace referencia en sus resultados Chakrabarti y cols., (1997) y al-Hedaithy y Fotedar (1997), donde es *C. tropicalis* la especie encontrada con más frecuencia.

Tabla XCVI. Comparación de aislados en orina con otros autores.

Autores	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Odds (1988)	55,4	20,2	8,9	4,1
Arévalo (1989)	54	12,6	20,7	6,9
Chen y cols., (1997)	50,8	11,7	17,6	8,2
Nuestros datos (2000)	53,2	10,6	22,3	10,6

IV.2.3.- AISLADOS DE LEVADURAS EN UÑAS.

En las muestras de uñas los aislados encontrados con mayor frecuencia fueron *C. parapsilosis* (40,8 %), seguido de las especies *C. albicans* (10,5 %), *C. guilliermondii* (7,9 %), *C. famata* (6,6 %) y *C. tropicalis* (6,6 %). Esto concuerda con los resultados mostrados por Segal y cols., (1996) y San Millán y cols., (1993), que también encuentran como el patógeno más frecuente causante de onicomycosis a *C. parapsilosis*, seguido de *C. albicans*. Estudios de Crespo-Erchiga y cols., (1994) concuerdan también con estos resultados, aislándose con más frecuencia *C. parapsilosis* (46,42 %), *C. albicans* (5,95 %), *C. tropicalis* (3,57 %) y *C. guilliermondii* (2,38 %). Otros autores, sin embargo, presentan a *C. albicans* como la especie más patógena en la uña, seguida de *C. parapsilosis* (Arenas, 1990; Faergemann, 1996).

Arévalo, en 1989, aisló a nivel ungueal 7 especies diferentes: *C. albicans* (62 %), *C. parapsilosis* (18 %), *C. tropicalis* (12 %), *C. guilliermondii* (4 %), *C. glabrata* (2 %), *C. krusei* (1 %) y *C. kefyr* (1 %). Podemos destacar la gran disminución en el aislamiento de *C. albicans* frente al considerable aumento de *C. parapsilosis*, siguiéndoles en proporciones inferiores y muy próximas entre sí especies como *C. guilliermondii* y *C. tropicalis* (Tabla XCVII).

Tabla XCVII. Comparación de aislados de uñas con otros autores.

Autores	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. tropicalis</i>
Arévalo (1989)	62	18	4	12
Crespo-Erchiga y cols., (1994)	29,8	46,4	2,38	3,57
Nuestros datos (2000)	10,5	40,8	7,9	6,6

IV.2.4.- AISLADOS DE LEVADURAS A PARTIR DE HEMOCULTIVOS.

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los hemocultivos, puede observarse que la especie que se aisló en mayor proporción fue *C. albicans* (40,4 %), seguida de *C. glabrata* (22,8 %), *C. tropicalis* (17,5 %), *C. parapsilosis* (10,5 %) y *C. inconspicua* (3,5 %). Nuestros datos son muy similares a los que presentan Pfaller y cols., (1998), tanto en las especies aisladas como en el porcentaje de aislamiento de las mismas. Se aproximan a las series de Odds (1988) y Arévalo (1989) en cuanto a las especies más frecuentemente aisladas (Tabla XCVIII).

Los resultados de Shin y cols., (1997) muestran en orden decreciente las especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Relación semejante a la obtenida por Sheppard y cols., (1999), a excepción de *C. krusei*. Mientras que Stratov y cols., (1998) aíslan en primer lugar *C. albicans* (63 %), luego *C. parapsilosis* (21 %), *C. glabrata* (10 %) y *C. krusei* (2 %).

Pfaller y cols., (1999), Kao y cols., (1999) y Yamamura y cols., (1999) encuentran una distribución muy similar a las anteriores, con *C. albicans* (53 %) como la especie mayoritaria, seguida de *C. parapsilosis* (21 %), *C. glabrata* (12 %) y *C. tropicalis* (6 %). Tabla XCVIII.

El trabajo de Colombo y cols., (1999) recoge la siguiente serie: *C. albicans* (37 %), *C. parapsilosis* (25 %), *C. tropicalis* (24 %), *C. rugosa* (5 %) y *C. glabrata* (4 %). Pavese y cols., (1999) y Hung y cols., (1996) también encontraron *C. albicans* como la especie más prevalente (50 %), *C. tropicalis* (18,2 %), *C. glabrata* (13,6 %) y *C. parapsilosis* (9,1 %). Tabla XCVIII.

Por otro lado, existen otros trabajos como los de Narang y cols., (1996) donde después de *C. albicans* (43,5 %) y *C. tropicalis* (21,7 %), encontramos a *C. guilliermondii* (13 %), especie aislada con poca frecuencia en la mayoría de los trabajos, siguiéndole *C. parapsilosis* (13 %) y *C. krusei* (8,7 %) (Tabla XCVIII).

Goldschmied-Reouven y Block (1991) en un estudio sobre 129 episodios de fungemia encuentran entre las especies mayoritarias a *C. albicans* (49 %), *C. tropicalis* (31 %) y *C. parapsilosis* (7 %). Tabla XCVIII.

Tabla XCVIII. Comparación de aislados en hemocultivos con otros autores.

Autores	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Odds (1988)	50,4	9,7	18,5	12,1
Arévalo (1989)	46,1	15,4	-	38,5
Goldschmied-Reouven y Block (1991)	49	-	31	7
Hung y cols., (1996)	50	14	20	9,2
Stratov y cols., (1998)	63	10	-	21
Pfaller y cols., (1998)	48	20	11	8
Pfaller y cols., (1999)	53	12	6	21
Colombo y cols., (1999)	37	4	24	25
Pavese y cols., (1999)	50	13,6	18,2	9,1
Yamamura y cols., (1999)	68,9	8,2	6,5	10,4
Nuestros datos (2000)	40,4	22,8	17,5	10,5

IV.2.5.- AISLADOS DE LEVADURAS DE CATÉTER.

C. tropicalis, con un 40,9 %, ha sido la especie aislada con más frecuencia, seguida por *C. albicans* (36,4 %), *C. parapsilosis* (13,6 %) y sólo en un 4,5 % se aisló *C. glabrata* y *C. norvengensis*.

Krcmery y cols., (1999) encontraron en infecciones fúngicas del tracto urinario a *C. albicans* como la especie más aislada (72 %), repartiéndose la proporción restante entre *C. tropicalis* y *C. krusei*. Bren (1998) cita entre las diferentes especies aisladas de pacientes de diálisis peritoneal ambulatoria un 15,4 % de *C. tropicalis* y de *C. parapsilosis*, un 7,7 % de *C. albicans* y *C. lusitaniae*, correspondiendo el resto a diferentes especies fúngicas (Tabla XCIX).

Tabla XCIX. Comparación de los aislados de catéter con otros autores.

Autores	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>
Bren (1998)	15,4	7,7	15,4	-
Nuestros datos (2000)	40,9	36,4	13,6	4,5

IV.2.6.- AISLADOS DE LEVADURAS DE MUESTRAS RESPIRATORIAS.

C. albicans (61,9 %) fue la especie aislada en mayor frecuencia y en porcentajes netamente inferiores *C. tropicalis* (14,3 %), *C. parapsilosis* (9,5 %) y *C. glabrata* y *C. meliobiosica* con un 4,8 % cada una.

Rello y cols., (1998) muestran en su trabajo que también fue *C. albicans* la especie más aislada, coincidiendo con nuestros resultados en el bajo aislamiento de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.3.- CULTIVOS MIXTOS.

En nuestro estudio obtuvimos 22 cultivos mixtos, de los que se aislaron 45 especies. Estos cultivos procedían en su mayor parte de tomas de uñas (36,4 %), seguidas de muestras de origen vaginal (27,3 %), muestras respiratorias (9,1 %) y en una proporción muy inferior (4,5 %) muestras procedentes de catéter, piel, coprocultivo, orina y orofaringe.

En cuanto a las especies aisladas en cada cultivo, pudimos comprobar que las especies que mayoritariamente aparecían mezcladas correspondían a *C. albicans* y *C. parapsilosis*, sobre todo en muestras vaginales, esta mezcla también se observa en un cultivo de uñas. El resto de las combinaciones de especies fue muy variado, no pudiendo establecer un patrón a destacar.

Contreras y cols., (1996) encontraron una prevalencia de cultivos mixtos en muestras clínicas frescas del 11,7 %, frente al 4,7 % de cultivos mixtos encontrados en las muestras recibidas en nuestro laboratorio. Una mayor incidencia de cultivos mixtos fue detectada por Powell y cols., (1998) con un 22,4 %, Baumgartner y cols., (1996) un 27,4 % y por San-Millán y cols., (1996) un 38,7 %, con dos o más especies por cultivo. Al-Rawi y Kavanagh (1999) obtuvieron un 7,1 % de cultivos mixtos en muestras vaginales.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.4.- MÉTODO DE REFERENCIA: API ID 32C®.

De las pruebas de identificación comercializadas, el sistema API ID 32C, ha sido el utilizado en más ocasiones como el método de referencia (Contreras y cols., 1996; Heelan y cols., 1996; San-Millán y cols., 1996); Quindós y cols., 1997; Heelan y cols., 1998; Campbell y cols., 1999; Hoppe y Frey, 1999; Koehler y cols., 1999; Sheppard y cols., 1999; Smith y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999). A partir de los resultados obtenidos por este método se han realizado las comparaciones entre los diferentes métodos utilizados. Se han calculado distintos parámetros, como son la especificidad y sensibilidad de cada técnica, así como su eficiencia, con el fin de poder establecer la validez de las técnicas.

Hay que indicar que el número de especies identificadas con los distintos métodos no coincide, por lo que no se ha podido comparar la identificación realizada por API ID 32C® del número total de especies con el resto de los diferentes métodos de nuestro estudio.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.5.- COMPARACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y EL API ID32C®.

IV.5.1.- API ID 32C® - TEST DE FILAMENTACIÓN EN SUERO.

Esta prueba consiste en la capacidad de *C. albicans* de crecer en forma de hifa a partir de blastoporas que se incuban en suero a 37 °C durante 3 ó 4 horas. Algunos autores han recomendado otros medios diferentes al suero para la formación de tubos germinativos como el caldo de tripticasa soja (Joshi y cols., 1973) y también medios sintéticos que están más estandarizados que el suero: diferentes medios de peptona como el medio Bacto-peptona 1 % (Auger y Joly, 1977), medios químicamente definidos y medios de cultivo de tejidos como el TC 199 (Hasenclever, 1977) y un medio mineral aireado enriquecido con vitaminas y una baja concentración de glucosa, 5 mmol/l (Hrmová y Drobica, 1981). Para inducir la conversión de la forma blastopora (levadura) a la forma micelial basta con la presencia de aminoácidos que son la fuente de nitrógeno necesaria para esta actividad morfológica. Ahora bien, según los sueros existen gran variación en cuales son los aminoácidos necesarios para la filamentación y por esta razón los medios sintéticos químicamente definidos compuestos por diferentes aminoácidos, sales inorgánicas, biotina y glucosa no son tan seguros como el suero o el medio de cultivo de tejidos (Gallach, 1989). Esta conversión morfológica es compleja y no todos los sueros comparten los requerimientos materiales (Shepherd y cols., 1985; Hasenclever, 1977). Nosotros optamos por emplear el suero humano por su facilidad de obtención en el propio laboratorio y por sus buenas características para la formación del tubo germinativo de *C. albicans*.

IV.5.1.1.- Concordancia entre API ID 32C®-test de filamentación en suero.

El número de aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el test de filamentación resultó ser de 525, de los cuales 226 han sido identificados como *C. albicans* y 274 *C. no albicans* por ambos métodos, mientras que nos encontramos con discrepancias en 16 *C. albicans*, cuya filamentación resultó ser negativa y 9 *C. no albicans* con resultado positivo en el test de filamentación.

La correlación entre ambas pruebas resultó tener un índice Kappa (0,889), índice que nos mide la concordancia entre dos técnicas diferentes, valorándose la concordancia como casi perfecta.

Como ha sido documentado, la prueba del tubo germinativo puede dar resultados inexactos. Hay aislamientos de *C. albicans* que no forman tubos germinativos, pero se ajustan a todos los otros aspectos de la descripción estándar de *C. albicans*. Dealler, en 1991, encontró falsos negativos en un 3,7 % de los sueros; coincidiendo la mayoría de los autores en decir que sobre el 5 % de las especies *C. albicans* no presentan tubos germinativos (Salkin y cols., 1987; Perry y Miller, 1987; Odds, 1988; Crist y cols., 1996; Campbell y cols., 1998). Este hecho se observa también en nuestros resultados, donde se produjeron discrepancias entre este método de identificación y el API ID 32C®, al existir un 6,6 % de falsos negativos frente al 93,4 % de concordancia entre ambos métodos. A la inversa, algunos aislamientos de levaduras con las propiedades fisiológicas de *C. tropicalis* forman, según Tierno y Milstoc (1978 y 1979) y Martín y White (1981; Martín, 1979), tubos germinativos en suero. Hecho que subrayan en su trabajo Perry y Miller (1987). Ahora bien, cabe remarcar que los tubos germinativos de otras especies diferentes de *C. albicans* son pseudohifas y, por tanto, generalmente, tienen constricciones marcadas a nivel de la unión entre el tubo germinativo y la blastopora (Hedden y Buck, 1980). Nosotros obtuvimos un 3,7 % de especies *C. no albicans* con resultados positivos a la filamentación, de las que el 1,7 % corresponde a *C. parapsilosis*, un 0,8 % a *C. glabrata* y *C. tropicalis*, y el 0,4 % a *C. lusitaniae* (Figuras 47 y 48 y tabla C).

Nosotros encontramos valores de sensibilidad y especificidad del orden del 93,8 % y 96,8 %, respectivamente. Datos que se acercan bastante a los obtenidos por otros autores, como Dealler (1991), que obtuvo un 98 % de sensibilidad y un 95 % de especificidad. Una sensibilidad un poco menor a la de Dealler y más cercana a la obtenida en nuestro trabajo fue la que obtuvieron Crist y cols., (1996), del orden del 94,7 % y una especificidad mucho más alta del 99,3 %. Para Perry y cols., (1990) la sensibilidad y especificidad para el test de la filamentación en suero exceden del 99 %. Los resultados de Heelan y cols., (1996) presentan una correlación perfecta entre ambos métodos y con una sensibilidad y especificidad del 100 %.

El test de filamentación en suero es un método popularmente empleado en la identificación de *C. albicans* por su rapidez y su bajo coste, pudiéndose ver reducido la pequeña proporción de falsos negativos y falsos positivos resultantes con un apropiado entrenamiento del personal.

Tabla C. Distribución de levaduras según la formación del tubo germinativo.

	Frecuencia (n=527)	Porcentaje
<u>Negativo</u>	292	55,4
<i>Candida parapsilosis</i>	74	25,3
<i>C. tropicalis</i>	69	23,6
<i>C. glabrata</i>	46	15,7
<i>C. lusitaniae</i>	19	6,5
<i>C. albicans</i>	16	5,5
<i>C. famata</i>	9	3,1
<i>C. guilliermondii</i>	8	2,7
<i>Rhodotorula rubra</i>	8	2,7
<i>C. krusei</i>	7	2,4
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	1,4
<i>Cr. laurentii</i>	4	1,4
<i>Prototheca etchell/carsonii</i>	3	1,0
<i>R. glutinis</i>	3	1,0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	3	1,0
<i>C. inconspicua</i>	2	0,7
<i>C. intermedia</i>	2	0,7
<i>C. meliobiosica</i>	2	0,7
<i>Candida spp.</i>	2	0,7
<i>Cr. unigutulatus</i>	2	0,7
<i>R. minuta</i>	2	0,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	0,7
<i>C. globosa</i>	1	0,3
<i>C. humicola</i>	1	0,3
<i>C. norvengensis</i>	1	0,3
<i>T. capitatum</i>	1	0,3
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	0,3
<u>Positivo</u>	235	44,6
<i>C. albicans</i>	226	96,2
<i>C. parapsilosis</i>	4	1,7
<i>C. glabrata</i>	2	0,8
<i>C. tropicalis</i>	2	0,8
<i>C. lusitaniae</i>	1	0,4

C., *Candida*; *Cr.*, *Cryptococcus*; *R.*, *Rhodotorula*; *T.*, *Trichosporon*

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

FIGURA 47
FILAMENTACIÓN NEGATIVA
POR ESPECIES

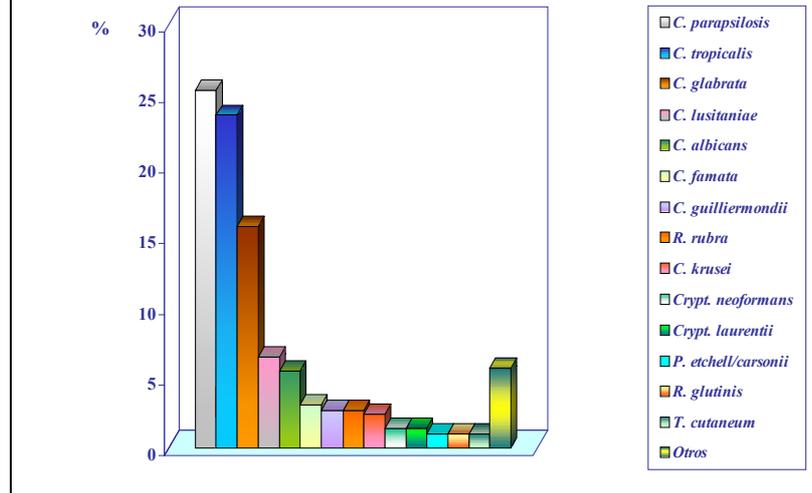
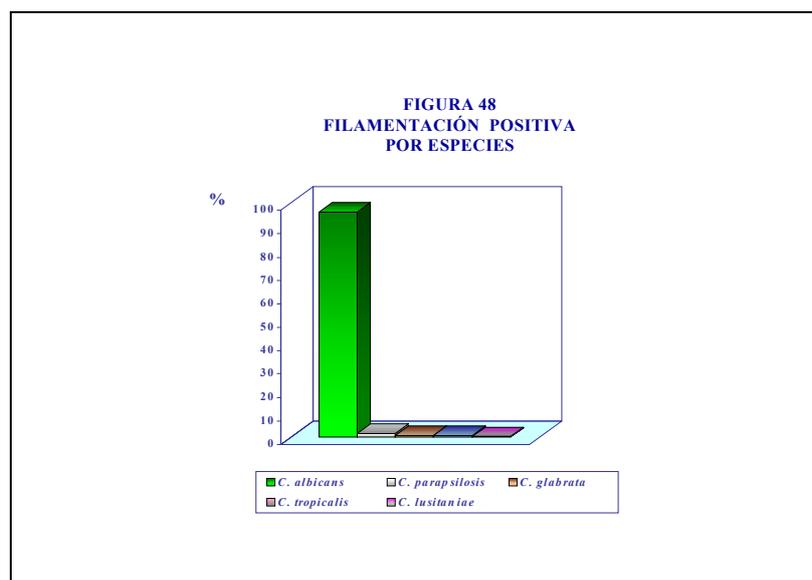


FIGURA 48
FILAMENTACIÓN POSITIVA
POR ESPECIES



IV.5.1.2.- Comportamiento de otras especies clínicas más relevantes.

De acuerdo a la bibliografía, en nuestro estudio observamos un total de 2,9 % de *C. tropicalis* que dieron filamentación positiva, proporción no concordante con el API ID 32C®. A este respecto, Perry y Miller (1987) han encontrado una proporción del 4 % de especies *C. tropicalis* que dieron positivo en el test de filamentación en suero.

También, aunque en la bibliografía revisada no encontramos casos de otras especies que resultasen positivas al test de filamentación en suero, en nuestro trabajo encontramos un total de 4,9 % de *C. parapsilosis* y 4,3 % de *C. glabrata* que dieron filamentación positiva.

IV.5.2.- API ID 32C® - ALBICANS ID2®.

La técnica *Albicans* ID2® se caracteriza por presentar mejores resultados que los restantes métodos que usan sustrato de hexosaminidasa para la detección y rápida identificación de *C. albicans* (Perry y Miller, 1987; Manafi y Willinger, 1991; Rousselle y cols., 1994; Willinger y cols., 1994; Contreras y cols., 1996). El tiempo de trabajo del técnico se ve disminuido porque se trata de un medio de identificación directa de *C. albicans* por la lectura de los resultados de las colonias en el cultivo primario. Esta propiedad es especialmente útil cuando *C. albicans* está asociada con otras levaduras en muestras clínicas. El color distintivo y único de los aislados de *C. albicans* permite una presuntiva identificación segura de esta especie sin manipulaciones de laboratorio. Este hecho sólo hace que la técnica *Albicans* ID2® tenga notable consideración para el aislamiento rutinario de levaduras. Además, la presencia de gentamicina y cloranfenicol en el medio previene el crecimiento de bacterias y facilita el desarrollo fúngico.

IV.5.2.1.- Concordancia entre API ID 32C®-ID2®.

En la identificación mediante *Albicans* ID2 de los aislados de *C. albicans* según resultados del API ID 32C® nos encontramos con una proporción del 98,2 % identificada correctamente, mientras que hubo discrepancia en el 1,8 %. Los trabajos de Contreras y cols., (1996) también muestran una concordancia del 97,6 % en la identificación de *C. albicans*.

Analizado el índice Kappa (0,941) muestra una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas. Hecho que se corrobora con los resultados obtenidos en sensibilidad y especificidad. Estos fueron del orden del 98,2 % para la sensibilidad y del 96,6 % para la especificidad, valores bastante altos y que están en correlación con los obtenidos por la mayoría de los autores. Los valores recogidos en la bibliografía (Lipperheide y cols., 1993; Odds y Bernaerts., 1994; De Champs y cols., 1995; Baumgartner y cols., 1996; Contreras y cols., 1996) muestran una sensibilidad entre

el 93,8 % al 100 %, así como especificidades que van desde el 90,3 % al 100 %. Freydière y cols., (1997) obtuvieron una sensibilidad del crecimiento en *Albicans* ID2® del 92,75 % después de 72 h de incubación. Autores como Rousselle y cols., (1994) encontraron también pocas discrepancias en la detección de *C. albicans* por ambos métodos.

Hoppe y Frey (1999) encontraron, por otro lado, una sensibilidad del 100 % y una especificidad superior al 97 % en la identificación de *C. albicans* (Tabla CI).

Tabla CI. Resultados comparativos entre nuestro trabajo y otros estudios.

Autores	Sensibilidad	Especificidad
Lipperheide y cols., (1993)	100	90,3
Rousselle y cols., (1994)	93,8	98,6
Willinger y Manafi (1994)	99,6	98,9
De Champs y cols., (1995)	96	97,9
Contreras y cols., (1996)	99,2	100
Freydière y cols., (1997)	92,75	92,75
Hope y Frey (1999)	99,7	99,3
Nuestros datos (2000)	98,2	96,6

IV.5.2.2.- Comportamiento de otras especies clínicas más relevantes.

A pesar que el *Albicans* ID2® es un método específico para el aislamiento de las especies de *C. albicans*, se conoce la existencia de falsos positivos. En nuestro estudio, al comparar con el método de referencia, observamos que un 3 % de *C. tropicalis* fueron identificadas como *C. albicans* con el ID2®. Valor un poco más alto es la proporción encontrada en los resultados de Baumgartner y cols., (1996) al aislar *C. tropicalis*, del orden del 7,1 %.

Nosotros encontramos también otras especies, como *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, en un 3,9 % y 4,4 %, respectivamente, que desarrollaron colonias características de *C. albicans* con el ID2® y no hemos encontrado otros trabajos que refirieran resultados parecidos.

IV.5.3.- API ID 32C® - BACTICARD-CANDIDA®

IV.5.3.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Bacticard Candida®.

El 95,2 % de los aislados identificados como *C. albicans* por el API ID 32C® coincidió con la identificación realizada con el Bacticard *Candida*®, habiendo una discrepancia del 4,8 %, que fue identificado como *C. no albicans* con este método.

El índice Kappa (0,845) analizado muestra una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas.

El Bacticard *Candida*® presentó, en el trabajo de Crist y cols., (1996), una sensibilidad del 99,3 % y una especificidad del 99,6 %, frente a nuestros resultados en los que encontramos una sensibilidad del orden del 95,2 %, pero una especificidad mucho menor, del 89 %. Sin embargo, Heelan y cols., (1996) encontraron una correlación completa con el método de referencia, con sensibilidades y especificidades del 100 % para la discriminación de *C. albicans* (Tabla CII).

Tabla CII. Resultados comparativos entre nuestro trabajo y otros estudios.

Autores	Sensibilidad	Especificidad
Crist y cols., (1996)	99,3	99,6
Heelan y cols., (1996)	100	100
Nuestros datos (2000)	95,2	89

IV.5.3.2.- Comportamiento de otras especies clínicas más relevantes.

Al analizar los resultados que obtuvimos con el Bactocard *Candida*® y compararlos con los trabajos realizados por otros autores, no encontramos referencias sobre los falsos positivos resultantes del Bactocard *Candida*®, en nuestro caso obtuvimos un 5 % de *C. tropicalis* identificadas como *C. albicans*, confirmándose que el 95 % no corresponde a *C. albicans*.

También obtuvimos un 28,9 % de *C. parapsilosis* que desarrollaron colonias características de *C. albicans*. Igual ocurre con un 14,3 % de *C. glabrata* identificadas como *C. albicans*.

IV.5.4.- API ID 32C® - CHROMALBICANS®.

IV.5.4.1.- Concordancia entre API ID 32C®-CHROMalbicans®.

Los aislados identificados por el método API ID 32C® y CHROMalbicans® han sido de 346, de los cuales 159 correspondieron a *C. albicans* y 129 a *C. no albicans* por ambos métodos. Las diferencias se presentaron en 13 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C®, que no desarrollaron coloración azul en CHROMalbicans®, y 27 *C. no albicans* con desarrollo de colonias de pigmentación característica de *C. albicans* en el CHROMalbicans®. Cabe asimismo destacar que no pudieron ser identificadas con precisión 18 especies en el CHROMalbicans por desarrollar colonias de pigmentación entremezclada.

Del total de 176 *C. albicans* identificadas con el API ID32C® y el CHROMalbicans®, el 91,5 % coincidió en la identificación.

El índice Kappa (0,672) analizado indica que existe una concordancia excelente entre las dos técnicas.

Los valores de sensibilidad y especificidad del CHROMalbicans® son del orden del 93,1 % y 85,4 %, respectivamente.

No se ha podido establecer comparaciones de nuestros datos con los de otros autores al no haber encontrado ninguna publicación sobre esta técnica cuando se realizó la búsqueda bibliográfica.

IV.5.4.2.- Comportamiento de otras especies clínicas más relevantes.

C. tropicalis, en un total de 9,8 %, dio características propias de *C. albicans* al desarrollarse en el agar , así como un 11,1 % de *C. parapsilosis* y un 16,7 % de *C. glabrata* identificadas con el API ID32C® y que el CHROMalbicans® las discriminó como *C. albicans*.

IV.5.5.- API ID 32C® - CHROMAGAR-CANDIDA®.

Los medios de cultivos diferenciales, basados en las distintas tonalidades de color que adquieren las colonias de muchos microorganismos al actuar sobre determinados componentes del medio, están cada vez más en auge. Las principales ventajas de estos medios son la detección de un patógeno determinado en una muestra y el reconocimiento de mezclas de microorganismos con características coloniales muy similares (Baumgartner y cols., 1996; García-Martos y cols., 1998). El CHROMagar *Candida*® soporta el crecimiento de levaduras aisladas clínicamente, pero retarda el crecimiento de las bacterias.

IV.5.5.1.- Concordancia entre API ID 32C®-CHROMagar *Candida*®.

De un total de 522 aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el CHROMagar *Candida*® han sido identificados como *C. albicans* 236 y 271 *C. no albicans* por ambos métodos, mientras que nos encontramos con discrepancias en 6 *C. albicans*, cuyo desarrollo en CHROMagar *Candida*® no coincidió con la pigmentación esperada de *C. albicans* y 9 *C. no albicans* con desarrollo típico de *C. albicans* en el CHROMagar *Candida*®.

Analizado el índice Kappa (0,942), se observa que existe una concordancia casi perfecta entre las dos técnicas.

De acuerdo con muchos autores, encontramos que el medio CHROMagar *Candida*® es de gran utilidad para la identificación de las especies de *Candida* más habituales en muestras clínicas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (Beighton y cols., 1995; Bernal y cols., 1996; Pfaller y cols., 1996; Freydière y cols., 1997; García-Martos y cols., 1998; Willinger y Manafi, 1999); otros autores cuestionan su eficacia en la identificación de *C. glabrata* (Odds y Bernaerts, 1994; Freydière, 1996; San Millán y cols., 1996; Koehler y cols., 1999). El color de las colonias de algunas levaduras puede variar ligeramente de un día a otro, por lo que es

importante fijar el tiempo de observación. Nosotros efectuamos la lectura de las placas a las 48 h para apreciar el color. Las coloraciones rosa, lila y blanca, son las compartidas por un mayor número de especies y las que ofrecen mayor dificultad interpretativa, siendo necesario recurrir a otros métodos de identificación.

Estos resultados que se ven confirmados por otros trabajos en los que también se observa el buen crecimiento e identificación de estas especies en este medio cromogénico (Odds y Bernaerts, 1994; Freydière y Gille, 1994; Bernal y cols., 1996; Freydière y cols., 1997), con sensibilidades y especificidades que pueden ser superiores al 100 %. Este crecimiento que se ve reflejado también en los resultados obtenidos en nuestro estudio de la sensibilidad (97,5%) y la especificidad (96,8%) de este medio.

IV.5.5.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida albicans*.

Han sido identificadas 242 *C. albicans* con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, de las cuales el 97,5 % coincidieron en la identificación con ambos métodos, mientras que hubo discrepancias en el 2,5 %. Estos resultados fueron similares a los descritos por otros autores, como Odds y Bernaerts (1994), Ainscough y Kibbler (1998) y Anson Allen (1997) con un 100 % de especificidad para *Candida albicans*. Esto permite la confirmación directa de la presencia de esta especie en el medio sin la necesidad de realizar pruebas adicionales como el test de filamentación en suero.

Otros estudios como el de Freydière y cols., (1997) confirman la elevada sensibilidad del medio, obteniendo un valor del 88,57 % tras 72 h de incubación, rango un poco inferior a la sensibilidad obtenida en nuestro estudio.

Nuestros datos están más en consonancia con los resultados referidos en los trabajos de autores como Willinger y cols., 1994; De Champs y cols., 1995; Baumgartner y cols., 1996; Bernal y cols., 1996; Pfaller y cols., 1996; San Millán y cols., 1996; Giusiano y Mangiaterra, 1998; Powell y cols., 1998, con sensibilidades superiores al 90 %.

B.- *Candida tropicalis*

Han sido identificadas 69 *C. tropicalis* con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, de las cuales el 97,1 % coincidieron en la identificación con ambos métodos, mientras que hubo discrepancias en el 2,9 %, que desarrollaron color característico de *C. albicans*.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Baumgartner y cols., 1996; San-Millán y cols., 1996; Giusiano y Mangiaterra, 1998), que ponen de manifiesto las excelentes propiedades de este medio en la identificación de *C. tropicalis*.

C.- *Candida parapsilosis*

Han sido identificadas 81 aislados con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, de las cuales el 96,3 % coincidieron en la identificación como *C. parapsilosis* en ambas técnicas, mientras que el 3,7 % fueron identificadas como *C. albicans* en el CHROMagar *Candida*®.

D.- Candida glabrata.

Han sido identificadas 47 aislados con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, existiendo una concordancia del 85,1 % entre ellas, desarrollando un 14,9 % otro tipo de colonias propias de otras especies de levaduras.

En la mayoría de los estudios efectuados se resalta que el CHROMagar presenta una menor sensibilidad para identificar *C. glabrata* (Odds y Bernaerts, 1994; Freydière, 1996; Pfaller y cols., 1996; San Millán y cols., 1996; Freydière y cols., 1997); por el contrario, Pfaller y cols., (1996) y Bernal y cols., (1996) encontraron una elevada sensibilidad, del 94 al 98,9 %, en la identificación de *C. glabrata* .

E.- Candida krusei.

Han sido identificadas 7 aislados con el API ID32C® y el CHROMagar *Candida*®, existiendo una concordancia del 87,5 % entre ellas, un 14,3 % desarrolló colonias correspondientes a *C. tropicalis*.

Estos datos que se aproximan a los resultados obtenidos por Bernal y cols., (1996) y San Millán y cols., (1996), quienes identificaron correctamente todas las colonias de *C. krusei*. Mientras que Baumgartner y cols., (1996) encontraron un 75 % de concordancia al identificar esta especie.

IV.5.6.- API ID 32C® - MICROSCAN RAPID YEAST IDENTIFICATION®.

El MicroScan® es uno de los dos sistemas enzimáticos comercialmente útil para la identificación de organismos tipo levaduras importantes médicamente. Estos sistemas son relativamente nuevos en el mercado (St.-Germain y Beauchesne, 1991), donde la primera versión de este sistema ha sido evaluada por Land y cols., (1991).

IV.5.6.1.- Concordancia entre API ID 32C®-MicroScan Rapid Yeast Identification®.

De un total de 181 aislados identificados por la técnica comercializada API ID 32C® y el MicroScan® han sido identificados como *C. albicans* 55 y 112 como *C. no albicans* por ambos métodos. No coincide la identificación de 4 *C. albicans* según el API ID 32C®, que en el MicroScan® resultaron ser *C. no albicans* y 9 *C. no albicans* que fueron identificadas en el MicroScan® como *C. albicans*.

La sensibilidad encontrada en nuestro trabajo ha sido del 93,3 % y una especificidad del 93,6 % para esta técnica.

El índice Kappa (0,843) muestra una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas.

Muchos trabajos hablan de la seguridad en la identificación de levaduras del MicroScan® mucho más baja que el API y el Vitek® (El-Zaatari y cols., 1990; Dooley y cols., 1994; Fenn y cols., 1994; Riddle y cols., 1994). Land y cols., (1991) han señalado una correlación del 92 % entre ambos métodos para las especies incluidas en sus bases de datos y una correlación del 85 % para todas las levaduras testadas. St-Germain y Beauchesne (1991) han descrito un rango de identificación del 78 % sin pruebas adicionales y una proporción del 96,6 % cuando se usan pruebas adicionales. Por otro lado, Riddles y cols., (1994) han reseñado una correcta identificación del 82 % de los casos.

IV.5.6.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida albicans*.

Con las técnicas API ID32C® y MicroScan® han sido identificados 59 aislados, de estos el 93,2 % coincidieron en el resultado, pero un 6,8 % de los mismos fueron identificados como *C. tropicalis* por el MicroScan®.

El trabajo de Land y cols., (1991) refiere que el 100 % de *C. albicans* fueron correctamente identificadas, resultados que coinciden con los obtenidos por St-Germain y Beauchesne (1991).

B.- *Candida tropicalis*

Con las técnicas API ID32C® y MicroScan® han sido identificados 27 aislados, de estos el 96,3 % coincidieron en el resultado, un 3,7 % de los mismos fueron identificados como *C. albicans* por el MicroScan®.

También obtuvieron muy buenos resultados con el MicroScan® otros autores, como Land y cols., (1991) y St-Germain y Beauchesne (1991), con un 100 % de los aislados identificados correctamente.

C.- *Candida parapsilosis*.

Con las técnicas API ID32C® y MicroScan® han sido identificados 34 aislados, de estos el 85,3 % coincidieron en el resultado y el 14,7 % restante fueron identificados como otras especies diferentes a *C. parapsilosis* por el MicroScan®.

C. parapsilosis fue identificada con un 96 % de concordancia con el API ID 32C® en los trabajos de Land y cols., (1991) y un 100 % por St-Germain y Beauchesne (1991).

D.- Candida glabrata

Con las técnicas API ID32C® y MicroScan® han sido identificados 17 aislados, apreciándose que un 76,5 % de los mismos han coincidido en el resultado, pero que un 23,5 % fueron identificados como otras especies diferentes a *C. glabrata* por el MicroScan®.

Al comparar con otros autores observamos que las proporciones son superiores a los nuestros, un 100 % en los trabajos de Land y cols., (1991) y un 97,5 % en los de St-Germain y Beauchesne (1991) al identificar sus cepas de *C. glabrata*.

IV.5.7.- API ID 32C® - VITEK YEAST BIOCHEMICAL CARD®.

El Vitek® es un sistema diseñado para dotar al laboratorio clínico de la capacidad para una identificación de levaduras rápida y segura. Estudios de este método de identificación en los años 80 demostraron que presentaba del 85 al 96 % de seguridad, con algunos problemas, como la dificultad en la identificación de levaduras poco comunes, la necesidad por pruebas morfológicas que ayudaran en la identificación y en la necesidad de un tiempo adicional de incubación (Oblack y cols., 1981; Hasyn y Buckley, 1982; Land y cols., 1984), que se han ido subsanando con el paso del tiempo (El-Zaatari y cols., 1990; Forsythe y cols., 1990; Quinn y Horstmeier, 1990; Rohm y cols., 1990; Simmonds y cols., 1990; Yamane y cols., 1990; Fenn y cols., 1994).

IV.5.7.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Vitek Yeast Biochemical Card®.

Los aislados identificados por API ID 32C® y el Vitek® han sido un total de 158, de los cuales 41 (93,2 %) han coincidido en la identificación por ambos métodos como *C. albicans* y 110 *C. no albicans*. Mientras que las diferencias se han encontrado en 3 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C®, cuya identificación en el Vitek® fue de *C. no albicans* y 4 *C. no albicans* que fueron identificadas en el MicroScan® como *C. albicans*. Datos que concuerdan con los resultados obtenidos por Dooley y cols., (1994) y Fenn y cols., (1994).

El índice Kappa (0,891) muestra una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas.

Otros autores (Wadlin y cols., 1999) obtuvieron aislados correctamente identificados del orden del 86 %, valor un poco más bajo, pero próximo a los obtenidos por nosotros. Mientras que El-Zaatari y cols., (1990) obtuvieron un 99,2 % de aislados correctamente identificados con el Vitek®.

IV.5.7.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida albicans*.

Un total de 44 *C. albicans* identificadas con el API ID 32C® concordaron en un 90,9 % cuando se identificaron también con el Vitek®, frente al 9,1 % que resultaron ser *C. tropicalis* en el Vitek®.

C. albicans fue identificada correctamente en el 100 % de las veces por Wadlin y cols., (1999); El-Zaatari y cols., (1990), refieren un 98,4 % de concordancia en sus resultados.

B.- *Candida tropicalis*

De 18 aislados identificados como *C. tropicalis* con el API ID 32C®, el 88,9 % fueron igualmente identificados con el Vitek®, se presentaron discrepancias en un 11,1 %, que fueron identificadas como *C. parapsilosis* y *Prothoteca spp.*

Fenn y cols., (1994) hallaron un porcentaje de identificación correcta un poco menor que el obtenido en nuestro trabajo, alrededor del 76%. Wadlin y cols., (1999) coincidieron en la identificación de un 87,2 % de esta especie, datos que prácticamente son similares a los nuestros. El-Zaatari y cols., (1990) identificaron correctamente el 100 % de los aislados de *C. tropicalis*.

C.- *Candida parapsilosis*.

De 28 aislados identificados como *C. parapsilosis* con el API ID 32C®, el 82,1 % fueron igualmente identificados con el Vitek®, hubo discrepancias en un 17,9 %, que se identificaron como *C. lusitaniae*, *C. albicans* y *P. ohmeri*.

En cambio, Wadlin y cols., (1999) sólo obtuvieron un 70,4 % de concordancia entre ambos métodos para esta especie en concreto; El-Zaatari y cols., (1990) obtuvieron un porcentaje de identificación correcta del 98,3 % y Fenn y cols., (1994) un 95,7 %.

D.- Candida glabrata

De 14 aislados identificados como *C. glabrata* con el API ID 32C®, el 85,7 % fueron igualmente identificados con el Vitek®, se observaron discrepancias en un 14,3 %, correspondiendo a especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

En este caso, la concordancia obtenida por Wadlin y cols., (1999) fue del 97,1 %, así porcentajes más elevados que los nuestros recogen en sus trabajos Fenn y cols., (1994) y El-Zaatari y cols., (1990), del orden del 99 % y 100 %, respectivamente.

IV.5.8.- API ID 32C® - RAPID YEAST PLUS SYSTEM®.

El RapID Yeast Plus System® es un sistema muy fácil de inocular y en su lectura emplea un indicador de pH. Siendo esta característica la razón por la que, en ocasiones, la lectura puede resultar dificultosa, pues el cambio de color de un verde a un amarillo puede ser engorroso de determinar. Pero, de todas formas, este sistema de identificación es el más rápido y puede tenerse la identificación de una levadura el mismo día.

IV.5.8.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Rapid Yeast Plus System®.

Un total de 107 aislados han sido identificados por el método API ID 32C® y el RapID Yeast Plus System®, coincidiendo en el resultado de la identificación 50 *C. albicans* y 49 *C. no albicans* por ambos métodos. Existen discrepancias en el resultado de 5 aislados identificados como *C. albicans* según el API ID 32C® y *C. no albicans* con el método RapID Yeast Plus System y 3 *C. no albicans* que fueron identificadas con el RapID Yeast Plus System® como *C. albicans*.

El índice Kappa (0,883) indica una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas.

Nuestros estudios muestran una concordancia del RapID Yeast Plus System® del orden del 90,9 %, datos que se asemejan bastante a los obtenidos por autores como Kitch y cols., (1996), quienes encontraron un valor del 94,1 % en la identificación de los aislados testados, requiriendo un 3,9 % pruebas extras para asegurar su correcta identificación. También Espinel-Ingroff y cols., (1998) encontraron una elevada concordancia (97 %) entre ambos métodos de identificación, al igual que Wadlin y cols., (1999) del 96 % o Heelan y cols., (1998) del 99 %.

IV.5.8.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida albicans*.

El 90,9 % de un total de 55 aislados correspondió a *C. albicans* en ambas técnicas, mientras que el 9,1 % fueron identificadas como *C. no albicans* con el RapID Yeast Plus System®.

Como ya hemos comentado anteriormente, estos resultados son un poco inferior a los referidos por otros autores (Kitch y cols., 1996; Espinel-Ingroff y cols., 1998; Heelan y cols., 1998; Smith y cols., 1999; Wadlin y cols., 1999), cuya concordancia entre el RapID Yeast Plus System® y el API ID 32C® está entre 94,1 % y 99 %.

B.- *Candida tropicalis*

El 100 % de los aislados identificados como *C. tropicalis* con API ID 32C® y con el RapID Yeast Plus System® coincidieron en ambas técnicas.

Wadlin y cols., (1999) también obtuvieron un 100 % de aislados identificados correctamente por medio de este método. Resultados equivalentes a los obtenidos por Smith y cols., (1999).

C.- *Candida parapsilosis*.

Identificados 11 aislados de *C. parapsilosis* con la técnica del RapID Yeast Plus System® nos encontramos un grado de concordancia entre esta técnica y el API ID 32C® del 81,8 %, identificándose el resto como *C. albicans*.

92,6 % fue la concordancia encontrada por Wadlin y cols.,(1999) al realizar esta técnica para la identificación de *C. parapsilosis* y del 95 % para Smith y cols., (1999).

D.- Candida glabrata

Solamente un aislado de *C. glabrata* se identificó con el RapID Yeast Plus System®, coincidiendo en la identificación.

Consideramos que un solo aislado no es suficiente para poder comparar dos técnicas. No obstante, Wadlin y cols., (1999) encontraron un 91,4 % de concordancia para esta especie en concreto y Smith y cols., (1999) un 95 % de semejanza.

IV.5.9.- API ID 32C® - AUXACOLOR®.

La habilidad de este sistema en identificar levaduras médicamente importantes radica en tener en cuenta, además del propio ensayo, aspectos morfológicos y fisiológicos, tales como la temperatura (37 °C), pigmentación de colonias aisladas, tinción de la cápsula por medio de la tinta de India y morfología microscópica. Con esta modificación, la mayoría de los organismos identificados con los mismos perfiles podrían ser distinguidos en la base de tales suplementos (Schuffenecker y cols., 1993; Fricker-Hidalgo y cols., 1995).

IV.5.9.1.- Concordancia entre API ID 32C®-Auxacolor®.

De un total de 30 aislados identificados por API ID 32C® y el Auxacolor®, 15 han coincidido en la identificación por ambos métodos como *C. albicans* y 14 *C. no albicans*, existiendo tan solo un aislado cuya identificación difería, identificándose como *C. albicans* según el API ID 32C® y por el Auxacolor® se identificó como *C. no albicans*.

El Auxacolor® es un sistema de identificación de levaduras con una seguridad del 82 al 91 % según datos de Pípolo Milan y cols., (1997), que se ven corroborados con otros trabajos de diferentes autores (Schuffenecker y cols., 1993; Davey y cols., 1995; Fricker-Hidalgo y cols., 1995; Campbell y cols., 1999; Sheppard y cols., 1999). Nosotros encontramos, valores de sensibilidad y especificidad para el Auxacolor® de 93,7 % y 100 %, respectivamente.

IV.5.9.2.- Concordancia en la identificación de las especies clínicas más relevantes.

A.- *Candida albicans*.

Para los 16 aislados identificados, el grado de concordancia entre ambas técnicas fue del 93,7 %.

Sheppard y cols., (1999) encontraron un 100 % de concordancia entre ambas técnicas al identificar *C. albicans*. Por otro lado, Campbell y cols., (1999) al identificar aislados de *C. albicans*, encontraron que en un 9,1 % las identificaciones no coincidieron con el resultado del método de referencia, valor más elevado que el encontrado por nosotros (6,3 %).

La proporción de aislados de *C. albicans* correctamente identificados por Auxacolor® es un poco más baja (86,7 %) en el trabajo de Fricker-Hidalgo y cols., (1995).

B.- *Candida tropicalis*

De los 5 aislados identificados, el grado de concordancia entre ambas técnicas fue del 80 %, siendo identificado un 20 % como *C. parapsilosis*.

Los resultados de Fricker-Hidalgo y cols., (1995) muestran un 100 % de concordancia en los aislados de esta especie identificados. Sheppard y cols., (1999) encontraron también un 100 % de concordancia entre estas técnicas con esta especie. Existiendo una pequeña discrepancia en los resultados de Campbell y cols., (1999) del orden de 5 %.

C.- Candida parapsilosis.

De los 6 aislados identificados, el grado de concordancia entre ambas técnicas fue del 100 %.

El Auxacolor® es un método de identificación excelente para muchos autores (Campbell y cols., 1999; Sheppard y cols., 1999) en la identificación de *C. parapsilosis*, que también obtuvieron para esta especie un 100 % de concordancia. Asimismo, Fricker-Hidalgo y cols., (1995) logran una coincidencia del 91,7 % entre esta técnica y el API ID 32C ®.

IV.5.10.- API ID 32C® - KRUSEI-COLOR®.

Esta técnica tan sólo se realizó en 12 cepas por no disponer de suficiente material. Limitamos el ensayo a las especies identificadas como *C. krusei* por la técnica de referencia API ID 32C®, siendo en todos los casos ambas técnicas coincidentes en el resultado.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.6.- VALIDACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN.

El API ID 32C® fue la técnica elegida como de referencia en nuestro estudio, y a partir de esta se ha realizado las distintas comparaciones entre los resultados obtenidos para el resto de métodos utilizados. Se han calculado distintos parámetros, como son la especificidad y sensibilidad de cada técnica, así como su eficiencia, con el fin de poder establecer la validez de las técnicas.

En la tabla CIII se muestra los valores obtenidos entre las diferentes técnicas empleadas en la identificación de *C. albicans*.

Tabla CIII. Validación de las diferentes técnicas para la identificación de *C. albicans*.

Técnica	Sensib.	Especif.	Eficien.	VPP	VPN
Test de filamentación	93,8%	96,8 %	95,5 %	96,2 %	94,8 %
<i>Albicans ID2</i> ®	98,2 %	96,6 %	97,2 %	94,7 %	98,8 %
CHROMalbicans ®	93,1 %	85,4 %	89,3 %	86,7 %	92,4 %
BactiCard Candida ®	95,2 %	89 %	92,3 %	90,8 %	94,2 %

Sensib., sensibilidad; **Especif.**, especificidad; **Eficien.**, eficiencia; **VPP**, valor predictivo positivo; **VPN**, valor predictivo negativo

Al comparar los métodos rápidos de identificación de *C. albicans* con el método de referencia se puede observar que *Albicans* ID2® es la técnica con mayor sensibilidad (98,2 %) frente al CHROMalbicans® que tiene índices de sensibilidad inferiores (93,1 %). Asimismo, la técnica más específica resultó ser el test de filamentación (96,8 %), seguida muy de cerca del *Albicans* ID2® (96,6 %), teniendo valores de especificidad mucho más bajos el BactiCard *Candida*® (89 %) y el CHROMalbicans® (85,4 %). *Albicans* ID2® es la técnica de mayor eficiencia (97,2 %) y siendo CHROMalbicans® (89,3 %) el método de menor eficiencia. Los valores predictivos positivos más altos lo presenta el test de filamentación en suero (96,2 %), seguido de *Albicans* ID2® (94,7 %), BactiCard *Candida*® (90,8 %) y en último lugar CHROMalbicans® (86,7 %). Los valores predictivos negativos resultaron más elevados para el *Albicans* ID2® (98,8 %), seguido del test de filamentación (94,8 %), BactiCard *Candida*® (94,2 %) y el CHROMalbicans® (92,4 %).

A la vista de los resultados obtenidos puede decirse que *Albicans* ID2® es la técnica más sensible, es decir, la que mejor detecta todos los resultados positivos, frente al CHROMalbicans® que resultó ser la técnica con menor sensibilidad. Contreras y cols., (1996) estudiando el medio *Albicans* ID2® encontraron una sensibilidad del 99,2 % y una especificidad del 100 %, datos que concuerdan con nuestra afirmación en que es el *Albicans* ID2® la técnica con mejores resultados a la hora de identificar *C. albicans*. Por otro lado, el test de filamentación es el método más específico, al contrario que el CHROMalbicans®.

En la tabla CIV se recogen los valores obtenidos de los parámetros estudiados, al comparar las restantes técnicas comerciales empleadas en la identificación de las distintas especies del género *Candida*, con el método de referencia.

Tabla CIV. Comparación de las diferentes técnicas de identificación de levaduras.

Técnica	Sensib.	Especif.	Eficien.	VPP	VPN
CHROMagar Candida®	97,5 %	96,8 %	97,1 %	96,3 %	97,8 %
MicroScan®	93,1 %	93,6 %	93,4 %	87,1 %	96,7 %
Vitek®	90,9 %	96,5 %	95 %	90,9 %	96,5 %
Auxacolor®	93,7 %	100 %	96,7 %	100 %	93,3 %
RapID Yeast Plus System®	94,3 %	91,8 %	93,1 %	92,6 %	93,7 %

Sensib., sensibilidad; **Especif.**, especificidad; **Eficien.**, eficiencia; **VPP**, valor predictivo positivo; **VPN**, valor predictivo negativo

Se observa que la técnica más sensible es CHROMagar *Candida*® (97,5 %), seguida del RapID Yeast Plus System® (94,3 %), Auxacolor® (93,7 %), MicroScan® (93,1 %) y Vitek® (90,9 %). Aunque debemos puntualizar que CHROMagar *Candida*® no es un método útil en la identificación de todas las especies, pero sí para su primer aislamiento.

El valor de la sensibilidad del CHROMagar *Candida*® es inferior al descrito por Odds y Bernaerts (1994), quienes no encontraron resultados falsos negativos para *Candida albicans*, pero coincide con el obtenido por otros autores (Pfaller y cols., 1996; San Millán y cols., 1996).

En cuanto a la especificidad, el Auxacolor® (100 %) es la técnica con la que obtuvimos mejores resultados, ocupando el segundo lugar CHROMagar *Candida*® (96,8 %), seguida del Vitek® (96,5 %), MicroScan® (93,6 %) y RapID Yeast Plus System® (91,8 %). El CHROMagar *Candida*® (97,1 %) presenta valores de eficiencia más altos, encontrándose después el Auxacolor® (96,7 %), Vitek® (95 %), MicroScan® (93,4 %) y RapID Yeast Plus System® (93,1 %). Los valores predictivos positivos más altos lo presenta el Auxacolor® (100 %), seguido de CHROMagar *Candida*® (96,3 %), RapID Yeast Plus System® (92,6 %), Vitek® (90,9 %) y en último lugar MicroScan® (87,1 %). Los valores predictivos negativos resultaron más elevados para el CHROMagar *Candida*® (97,8 %), seguido del

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

MicroScan® (96,7 %), Vitek® (96,5 %), RapID Yeast Plus System® (93,7 %) y el Auxacolor® (93,3 %).

IV.7.- SEROTIPADO DE *C. ALBICANS*.

Según Pfaller (1992), una comparación válida entre dos o más aislados no se puede realizar, a menos que, los procedimientos de tipado se hagan bajo condiciones idénticas y en un sistema de tipado epidemiológico ideal que fuera estandarizado, teniendo establecido precisión y reproducibilidad, ser estable en el tiempo, ser lo suficiente sensible para distinguir organismos que son similares, pero no idénticos, ser extensamente aplicable, útil, barato y tener un valor justificado basado en la investigación epidemiológica.

La prevalencia relativa de los dos principales grupos serológicos de *C. albicans*, A y B, en poblaciones de pacientes seleccionados ha estado determinada en muchas ocasiones. La mayoría de los estudios epidemiológicos hechos en Europa, Africa y Norte América han revelado una prevalencia más alta del serotipo A sobre el serotipo B en el hombre, frente a Stiller y cols., (1982) que refieren un 49 % del serotipo B en Estados Unidos. Gallach (1989) observó una prevalencia del 69,3 % del serotipo A, similar al estudio de candidiasis sistémica realizado en Barcelona a 43 adictos de heroína, donde el 60 % de los sueros de *C. albicans* aisladas eran del serotipo A (Miró y cols., 1987). De los 95 aislados incluidos en nuestro estudio, el serotipo A fue encontrado en mayor proporción (88,4 %) que el serotipo B, resultados que concuerdan con los recogidos por los otros autores.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.8.- CANDIDA DUBLINIENSIS.

El incremento de la incidencia de las infecciones producidas por hongos, a raíz de la aparición del SIDA y de otras enfermedades debilitantes, ha sido completado en su impacto con la aparición de especies fúngicas que previamente han sido raramente asociadas con enfermedades humanas e incluso con la aparición de fenómenos de resistencia a los antifúngicos. La principal es *C. albicans*, uno de los principales patógenos oportunistas de los pacientes infectados por VIH. No obstante se ha visto que con una relativa frecuencia se producían cambios en la epidemiología de la candidiasis de este grupo de pacientes, particularmente entre los que reciben terapia antifúngica, con incremento de la frecuencia de las infecciones causadas por especies distintas a *C. albicans*. Aunque la inherente disminución de la sensibilidad al uso de drogas antifúngicas pueden ser un importante factor en la emergencia de algunas de estas especies de *Candida* como patógenos oportunistas, la mejora de los métodos de detección, diagnóstico y clasificación también podrían haber contribuido (Coleman y cols., 1993; Sullivan y cols., 1996; Coleman y cols., 1998).

C. dubliniensis ha sido aislada principalmente en cavidades orales de individuos infectados por VIH con candidiasis oral (Kirkpatrick y cols., 1998). Se encuentra también asociada con infección oral en individuos no infectados por VIH con señales clínicas de candidiasis oral y se han hallado también en vagina de una pequeña proporción de mujeres, tanto VIH negativas como VIH positivas, que padecen candidiasis vaginal (Coleman y cols., 1997; Odds y cols., 1998; Sullivan y Coleman, 1998; Polacheck y cols., 2000).

En nuestro estudio, realizamos inmunofluorescencia indirecta a 95 muestras de *C. albicans*, no encontrando ningún aislado de *C. dubliniensis*, por esta razón se utilizaron 38 cepas de esta especie procedentes de otros centros hospitalarios con el fin de ampliar el estudio de las diferentes especies del género *Candida* y establecer la capacidad discriminadora del resto de métodos estudiados frente a esta especie de nueva descripción.

Pudimos observar que la especie *C. dubliniensis* desarrolla colonias verdes más oscuras que *C. albicans* en el medio CHROMagar *Candida*®, lo que está de acuerdo con los resultados de Koehler y cols., (1999). Además, no hay diferencias significativas con respecto a *C. albicans* en las características de las colonias desarrolladas en el medio de *Albicans* ID2®, aunque 5 (13,2 %) no presentaron el color azul característico de *C. albicans*.

Según Pincus y cols., (1999) el crecimiento comparativo a 42 °C para la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* dan resultados equívocos y sólo se podría usar para obtener una evidencia presuntiva en la identificación de *C. dubliniensis*. Así Koehler y cols., (1999) señalan que el crecimiento es pobre a 42 °C. Nuestros resultados muestran que la temperatura tampoco es una característica que pueda ayudar a la discriminación de esta especie, pues todas crecieron sin problema a 42 °C.

Los métodos moleculares son los que pueden discriminar con exactitud una especie de la otra, pudiendo considerarlos como los definitivos; pero el tiempo que requieren, su alto coste y el equipo especial que se necesita, hacen que no sea un método a menudo útil para algunos laboratorios clínicos.

IV.9.- REPRODUCIBILIDAD DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS.

En general, los buenos resultados obtenidos al reproducir con cepas patrón las diferentes técnicas estudiadas muestran la utilidad de las mismas en la identificación de las levaduras para un laboratorio microbiológico.

El API ID 32C®, al igual que el test de filamentación en suero, CHROMagar *Candida*®, CHROMalbicans®, *Albicans* ID2®, Bactocard *Candida*® y MicroScan®, fueron técnicas en las que no se encontraron discrepancias al coincidir siempre los resultados en cada una de ellas. No ocurrió lo mismo en las identificaciones realizadas por el Vitek®, tan sólo en el 63,7 % se obtuvo una buena reproducibilidad, en el 36,3 % restante hubo discordancia en los distintos ensayos realizados.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

IV.10.- PRUEBAS DE CRECIMIENTO A TEMPERATURAS Y TIEMPOS VARIABLES.

La influencia de la temperatura y el tiempo de incubación de las levaduras en el crecimiento de las mismas es un factor importante a estudiar. Si tenemos en cuenta una temperatura y un intervalo de tiempo variable, entre 24 y 48 h, se pudo observar que a 30 °C y a 37 °C se produce un buen desarrollo de la mayoría de las especies, alrededor de un 90 y 97 %. Sin embargo, el crecimiento que se ve ralentizado a 42 °C (a las 48 h un 21,5 % no crece). El incremento en el crecimiento entre 24 y 48 h de incubación es mayor en el caso de la temperatura de 30 °C. Parece ser que a partir de 37 °C se dificulta el crecimiento de las levaduras ensayadas.

Hubo un pequeño porcentaje de especies que no crecían transcurridas las 72 h, este hecho pudo deberse a que se trate de especies que requieran más tiempo de incubación.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

V.- CONCLUSIONES.

1.- Las levaduras aisladas de muestras clínicas, de distintas procedencias orgánicas, procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Canarias pertenecen en su mayoría, al género *Candida*, y en proporciones inferiores los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

2.- *Candida albicans* es la especie aislada con más frecuencia, independientemente de la procedencia orgánica de las muestras, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae*. El resto de especies del género *Candida* de importancia clínica se han identificado en una proporción muy inferior.

3.- El serotipo de *Candida albicans* que predomina en nuestro medio es el serotipo A sobre el tipo B con una diferencia estadísticamente significativa.

4.- Se obtuvo un número importante de cultivos mixtos, procedentes en su mayor parte de uñas, destacando la asociación *Candida albicans*-*Candida parapsilopsis*.

5.- El **API ID 32C®** ha sido seleccionado como método de referencia.

6.- El **test de filamentación en suero**, se mostró como un buen método para la discriminación de *Candida albicans*. Su dificultad radica en precisar técnicos experimentados en microscopía. Por su rapidez y sencillez puede seguir siendo el método de elección en la discriminación de *C. albicans*.

7.- Los medios cromogénicos pueden ser usados como medios primarios de aislamiento y diferenciación de *Candida* spp. en muestras clínicas, lo que disminuye la necesidad de realizar pruebas bioquímicas secundarias y son de gran utilidad en la detección de cultivos mixtos.

8.- El medio cromogénico **Albicans ID2®** se muestra como una excelente técnica para la identificación de *C. albicans*, con una elevada concordancia con el método de referencia API ID 32C®.

9.- **CHROMalbicans Agar®**, si bien presenta índices de sensibilidad y especificidad más bajos que los otros métodos de discriminación de *C. albicans*, muestra una buena concordancia con el método de referencia, lo que permite una adecuada detección y rápida identificación macroscópica de *C. albicans*.

10.- **CHROMagar Candida®** es un método para la identificación de levaduras, con alta sensibilidad y especificidad, teniendo la ventaja de ser un medio selectivo con capacidad de detectar cultivos mixtos de levaduras. Su utilización, en sustitución del agar de Sabouraud, facilita en mayor medida el estudio de la morfología de las colonias y permite diferenciar con más precisión, e incluso identificar, distintas especies de algunos géneros de levaduras presentes en muestras clínicas, prescindiendo, en muchas ocasiones, de pruebas adicionales.

11.- El **BactiCard-Candida®** muestra un elevado índice de sensibilidad y especificidad para la discriminación de aislados de *C. albicans*. Presenta la ventaja del corto período de incubación requerido y la dificultad de su lectura.

12.- El sistema **MicroScan Rapid Yeast Identification®** presenta una elevada correlación con el sistema de referencia para todas las especies de levaduras ensayadas. Presenta la ventaja de su fácil inoculación y lectura y un corto período de incubación. La expansión de su base de datos puede hacer de este método una excelente alternativa en la identificación de levaduras con importancia médica.

13.- El **Vitek Yeast Biochemical Card®** es un método eficaz para la identificación rápida y automatizada de aislados clínicos de levaduras presentes en su base de datos. Muestra una buena correlación con el método de referencia.

14.- **Auxacolor®** es un sistema excelente en la identificación correcta de un elevado porcentaje de especies del género *Candida*, pero se hace necesario

expandir su base de datos. Muestra una buena correlación con el método de referencia y presenta como ventaja la rapidez de la técnica, que combinándose con el test de filamentación en suero, puede ser una opción válida para la identificación de la mayoría de las especies del género *Candida*.

15.- En la identificación de *C. dubliniensis* los métodos moleculares son los definitivos, pero por el tiempo, su alto coste y el equipo especial que se requiere no es a menudo útil en la mayoría de los laboratorios clínicos.

16.- Las pruebas de crecimiento de *Candida* spp. realizadas a temperaturas y tiempos variables muestran que el rango idóneo de temperatura de incubación es de 30 o 37 °C y el tiempo de lectura óptimo puede fijarse a las 48 horas.

LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA DE PROCEDENCIA CLÍNICA. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

VI.- BIBLIOGRAFÍA.

- Abu-Elteen K, Abu-Alteen R. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol* 1998;21(1):41-48.
- Abu-Elteen K. Incidence and distribution of *Candida* species isolated from human skin in Jordan. *Mycoses* 1999;42(4):311-317.
- Afessa B, Gay P, Plevak D, Swensen S, Patel H, Krowka M. Pulmonary complications of orthotopic liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1993;68(5):427-434.
- Ahearn D, Jannach J *et al.* Speciation and densities of yeasts in human urine specimens. *Sabouraudia* 1966;5:110-119.
- Ahearn D. Identification and ecology of yeasts of medical importance. In Prier, J E and H Friedman (eds.), *Opportunistic Pathogens*. Baltimore. University Park Press 1974;pp 129-146.
- Ainscough S, Kibbler CC. An evaluation of the cost-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. *J Med Microbiol* 1998;47(7):623-638.
- Akiyama K, Mathison D, Riker J, Greenberger P, Patterson R. Allergic bronchopulmonary candidiasis. *Chest* 1984;85:699-701.
- Alexander J. Allergy in the gastrointestinal tract. *Lancet* 1975;2:1264.
- Al-Hedaithy S, Fotedar R. Prevalence of *Candida tropicalis* in clinical specimens from patients with variable clinical syndromes over a 5-year period. *Mycoses* 1997;40(3-4):111-113.
- Allen D, Ang B. The prevalence of invasive candidiasis in patients with extensive burns. *Ann Acad Med Singapore* 1992;21(5):656-659.

- Al-Rawi N, Kavanagh K. Characterisation of yeasts implicated in vulvovaginal candidosis in Irish women. *Br J Biomed Sci* 1999;56(2):99-104.
- Alteras I, Cojocaru I, Bálánescu A. Generalized candidiasis asociare with Addison's disease. *Mykosen* 1969;12:575-577.
- Alteras I, David M, Feuerman E, Morojonski G. Widespread cutaneous candidiasis and tinea infection masking mycosis fungoides. *Mycopathologia* 1982;80:83-88.
- Alteras I, Grigoriu D, Lazar M, Paroian I, Gravilescu M. Accidents a *Candida* des traitements par le Flagyl. *Dermatologica* 1965;131:309-314.
- Aly F, Blackwell C, Mackenzie D, Weir D. Identification of oral yeast species isolated from individuals with diabetes mellitus. *Mycoses* 1995;38(3-4):107-110.
- Aly R, Berger T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996;22(suppl 2):S128-S132.
- Amir L. *Candida* and the lactating breast: predisposing factors. *J Hum Lact* 1991;7(4):177-181.
- An Y, Wu X, Leng X. The nosocomial infection in ICU: characteristics and prevention. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chin* 1997;35(7):395-397.
- Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):43-51.
- André J, Achten G. Onychomycosis. *Int J Dermatol* 1987;26:481-490.
- Anhalt E, Alvarez J, Berg R. *Candida glabrata* meningitis. *South Med J* 1986;79:916-917.

- Anson JJ, Allen D. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and direct identification of yeast species from the female genital tract. *British J Biomedical Science* 1997;54:237-239.
- Anyon C, Desmond F, Eastcott D. A study of *Candida* in one thousand and seven women. *N Z Med J* 1971;73:9-13.
- Arenas R. Las onicomycosis. Aspectos clínico-epidemiológicos, micológicos y terapéuticos. *Gaceta médica de Mexico* 1990;126(2):84-90.
- Arendorf T, Walker D, Kingdom R, Roll J, Newcombe R. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. *Br Dent J* 1983;155:340-343.
- Arévalo Morales M P. Aislamiento e identificación de especies del género *Candida* en clínica humana. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. 1989.
- Argüero-Licea B, Garza-Garza D, Ruíz-Mendoza M, Gutiérrez M. Frecuencia de las especies de *Candida* aisladas de 93 pacientes con SIDA. *Rev Iberoamer Micol* 1993;10:66-68.
- Arnou P. Infections following orthotopic liver transplantation. *HPB Surg* 1991;3(4):221-232;discussion 232-233.
- Assantachai P, Suwanagool S, Gherunpong V, Charoensook B. Urinary tract infection in the elderly: a clinical study. *J Med Assoc Thai* 1997;80(12):753-759.
- Astagneau P, Maugat S, Tran-Minh T, Douard M, Longuet P, Maslo C, Patte R, Macrez A, Brucker G. Long-term central venous catheter infection in HIV-infected and cancer patients: a multicenter cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20(7):494-498.

- Atkinson K. Clinical bone marrow transplantation: a reference textbook. Cambridge, Cambridge University Press 1994.
- Audrey C. Sur l'évolution du champignon du muguet. Rev Med 1887;7:586-595.
- Auger P, Joly J. Factors influencing germ tube production in *Candida albicans*. Mycopathologia 1977;61:183-186.
- Auger P, Marquis G, Dallaire L, Joly L. Stunted growth of *Candida albicans* in human amniotic fluid *in vitro*. J Lab Clin Med 1989;95:272-281.
- Babajews A, Poswillo D Griffin G. Acquired immunodeficiency syndrome presenting as recalcitrant Candida. Br Dent J 1985;159:106-108.
- Baker J, Salkin I, Pincus D, D'Amato R. Use of rapid auxanographic procedures for recognition of an atypical *Candida*. J Clin Microbiol 1981;13(4):652-654.
- Banerjee S, Emory T, Culver D, Gaynes R, Jarvis W, Horan T, Edwards J, Tolson J, Henderson T, Martone W. Secular trends in nosocomial bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991;91(Suppl.3B):s86-s89.
- Bánóczy J, Albrecht M, Rigo O, Ember G, Ritlop B. Salivary secretion rate, pH, lactobacilli and yeast counts in diabetic women. Acta Diabetol Latina 1987;24:223-228.
- Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:189-193.
- Barberis I, Pajaro M, Godino S, Pascual L, Rodríguez I, Agüero M, Ordoñez C. Survey of sexually transmitted diseases in the region of Rio Cuarto. Medicina (B Aires) 1998;58(5 Pt 1):469-473.
- Barnett B, Stephens D. Urinary tract infection: an overview. Am J Med Sci 1997;314(4):245-249.

- Barnett J, Payne R, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge 1983; pp 1002.
- Barr C, Torosian J. Oral manifestations in patients with AIDS or AIDS-related complex. Lancet 1986;2:288.
- Barrett A, Kingsmill V, Speight P. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. Oral diseases 1998;4:26-31.
- Barturen B, Bikandi J, San Millán R, Moragues M, Regulez P, Quindós G, Pontón J. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. Microbiology 1995; 141: 1535-1543.
- Batura-Gabryel H, Firlik M, Wieczorek U. Evaluation of occurrence of fungal infection in patients with lung cancer. Med Dosw Mikrobiol 1994;46(1-2):79-81.
- Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. J Clin Microbiol 1996;34(2):454-456.
- Beasley J 3rd. Smoking and oral moniliasis. J Oral Med 1969;24:83-86.
- Becker W, Becker B, Newman M, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. Int J Oral Maxillofac Implants 1990;5:31-38.
- Beck-Sague C, Azimi P, Fonseca S, Baltimore R, Powell D, Bland L, Arduino M, McAllister S, Huberman R, Sinkowitz R, *et al*. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. Pediatr Infect Dis 1994;13(12):1110-1116.
- Beighton D, Hellyer P, Heath M. Association between salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts and black-pigmented *Bacteroides* spp and

dental variables in elderly dental patients. Arch Oral Biol 1990;35(suppl):173S-175S.

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford S, Pankhurst C, Tinsley G, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa N, Marren V, Lynch E. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol 1995;33(11):3025-3027.

Ben Joseph R, Wellish G, Levi M, Bassan H. *Candida albicans* endocarditis in a drug addict. Harefuah 1985;108:72-73.

Ben-Aryeh H, Berdicevsky Y, Zimmn P, Szargel R, Alroy G, Gutman D. Salivary composition and oral *Candida* in asthmatic children and the effect of inhaled drugs. J Oral Med 1985;40:123-126.

Bennett J. On the parasite vegetable structures found growing in living animals. Trans R Soc Edin 1844;15:277-294.

Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral *Candida* in asymptomatic denture wearers. Int J Oral Surg 1980;9:113-115.

Berg F. Om torsk hos Barn. Stockholm: L J Hjerta 1846.

Bergan T, Hollum A, Vangdal M. Evaluation of four commercial biochemical test systems for identification of yeasts. Eur J Clin Microbiol 1982;1(4):217-222.

Berkhout C. De Schimmelgeschlachten Monilia. Oidium, Oospora en Torula. Dissertation, Univ of Utrecht 1923.

Berkowitz R, Crock J, Strickland R, Gordon E, Strandjord S, Coccia P. Oral complications associated with bone marrow transplantation in a pediatric population. Am J Pediatr Hematol Oncol 1983;5:53-57.

- Berkowitz R, Hughes C, Rudnick M, Gordon E, Strandjord S, Cheung N, Warkentin P, Coccia P. Oropharyngeal *Candida* prophylaxis in pediatric bone marrow transplant patients. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1985;7:82-86.
- Bernal S, Martín Mazuelos E, Chavez M, Coronilla J, Valverde A. Evaluation of the new API *Candida* system for identification of the most clinically important yeast. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32(3):217-221.
- Bernal S, Martín Mazuelos E, García M, Aller A, Martínez M, Gutiérrez M. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;24(4):201-204.
- Bernhardt H.E, Orlando J.C, Benfield J.R, Hirose F.M, Foos R.Y. Disseminated candidiasis in surgical patients. *Surg Gynecol Obstet* 1972;134:819-825.
- Betta P. Pathology of some of the opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Pathologica* 1985;77:67-75.
- Beveridge M. Vaginal moniliasis after treatment of trichomonal infection with Flagyl. *Br J Vener Dis* 1962;38:220-222.
- Bhalodia M, Vega K, DaCosta J, Trotman B. Esophageal candidoma in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J Assoc Acad Minor Phys* 1998;9(4):69-71.
- Bignardi G, Savage M, Coker R, Davis S. Fluconazole and *Candida krusei* infections. *J Hosp Infection* 1991;18:326-327.
- Biguet J, Havez R, Tran van Ky P, Degaey R. Étude électrophorétique, chromatographique et immunologique des antigènes de *Candida albicans*. Caractérisation de deux antigènes spécifiques. *Ann Inst Pasteur* 1961;100:13-24.

Biguet J, Tran van Ky P, Andrieu S, Fruit J. Analyse immunoelectroélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Mycopathologia 1965;26:241-256.

Bikandi J, San Millán R, Moragues M, Cebas G, Clarke M, Coleman D, Sullivan D, Quindós G, Pontón J. Rapid Identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. J Clin Microbiol 1998;36(9):2428-2433.

Biolife. CHROMalbicans agar.

BioMérieux. Albicans ID2. Ref 43572. 1997.

BioMérieux. API 20 C AUX. Sistema de identificación de levaduras. 07628 B. 1997.

BioMérieux. ID 32 C. Sistema de identificación de levaduras. 30238-FC. 1993.

Bisschop M, Merkus J, Van Cutsem. The influence of antibiotics on the growth of *Candida albicans* in the vagina: an experiment with vaginal fluid. Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol 1985;20:113-119.

Bjornson H, Colley R, Bower R, *et al.* Association between microorganism growth at the catheter insertion site and colonization of the catheter in patients receiving total parenteral nutrition. Surgery 1982;92:720-727.

Blankhart D, Muller O, Gresenguet G, Weis P. Sexually transmitted infections in young pregnant women in Bangui, Central African Republic. Int J STD AIDS 1999;10(9):609-614.

Blyth W. The influence of antibiotics on experimental moniliasis. I. Penicillin, streptomycin, chloramphenicol and viomycin. Mycopathol Mycol Appl 1958;10:91-92.

- Bobey D, Bradna J, Florek-Ebeling D. Rapid detection of yeast enzymes using the API ZYM system. Abstr Ann Meeting. Amer Soc Microbiol Abstract C254 1980.
- Bobey D, Ederer G. Rapid detection of yeast enzymes by using 4-methylumbelliferyl substrates. J Clin Microbiol 1981;13:393-394.
- Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, Gibbs D, Hanak H, Hotchi M, Mall G, Martino P, Meunier F, Milliken S, Naoe S, Okudaira M, Scevola D, Van't Wout J. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11(2):99-109.
- Bodey G, Luna M. Skin lesions associated with disseminated candidiasis. J Am Med Assoc 1974;229:1466-1468.
- Bodey G. Candidiasis in cancer patients. Am J Med 1984;77:13-19.
- Bodey G. Fungal infections complicating acute leukemia. J Chronic Dis 1966;19:667-687.
- Bodey G. Fungal infections in cancer patients-an overview. New York. Pfizer International INC. 1990.
- Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durrussel C, Addo M, Pagani J, Chave J, Bille J. Cluster of atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. J Clin Microbiol 1995;33:1129-1135.
- Boero M, Pera A, Andriulli A, Ponti V, Canepa G, Palmas F, Duglio A, Molinaro G, Toselli M, Riccardino N. *Candida* overgrowth in gastric juice of peptic ulcer subjects on short- and long-term treatment with H₂-receptor antagonists. Digestion 1983;28:158-163.

- Boggs D, Williams A, Howell A. Thrush in malignant neoplastic disease. Arch Intern Med 1961;102:354-360.
- Bohme A, Karthaus M, Hoelzer D. Antifungal prophylaxis in neutropenic patients with hematologic malignancies: is there a real benefit?. Chemotherapy 1999;45(3):224-232.
- Bonorden H. Handbuch der allgemeinen mykologie. Stuttgart, E Schweizerbart 1815.
- Borzotta A, Beardsley K. *Candida* infections in critically ill trauma patients: a retrospective case-control study. Arch Surg 1999;134(6):657-664; discussion 664-665.
- Bouchara J, Declerck P, Cimon B, Planchenault C, de Gentile L, Chabasse D. Routine use of CHROMagar® *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. Clin Microbiol Infect 1996;2:202-208.
- Boucher H, Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. A novel group I intron in *Candida dubliniensis* is homologous to a *Candida albicans* intron. Gene 1996;180:189-196.
- Bourg R. Les candidases vaginales ont-elles une incidence hormonale?. Bull Acad Roy Méd Belg 1964;7:669-727.
- Bowman P, Ahearn D. Evaluation of commercial systems for the identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol 1976;4(1):49-53.
- Bowman P, Ahearn D. Evaluation of the Uni-Yeast-Tek kit for the identification of medically important yeasts. J Clin Microbiol 1975;2(4):354-358.
- Bozzetti F, Terno G, Camerini E, *et al.* Pathogenesis and predictability of central venous catheter sepsis. Surgery 1982;91:383-389.

- Bradford L, Montes L. Perioral dermatitis and *Candida albicans*. Arch Dermatol 1972;105:892-895.
- Brawner D, Hovan A. Oral candidiasis in HIV-infected patients. The AIDS Reader 1992;117-134.
- Bren A. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17(12):839-843.
- Bridger R. Superficial mycoses in a Southern New Zealand district. Sabouraudia 1979;17:107-112.
- Bridges C, Dasilva G, Yamamura M, Valdimarsson H. A radiometric assay for the combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans*. Clin Exp Immunol 1980;42:226-233.
- Brookes D, Hubbert R, Sarkany I. Skin flora of infants with napkin rash. Br J Dermatol 1971;85:250-254.
- Brooks R, Hofflin J, Jamieson S, Stinson E, Remington J. Infectious complications in heart-lung transplant recipients. Am J Med 1985;79:412-422.
- Bruneau S, Guinet R, Sabbagh I. Identification and antigenic comparison of enzymes in the genus *Candida* by means of quantitative immunoelectrophoretic methods: taxonomic significance. Sistem Appl Microbiol 1985;6:210-220.
- Bruns J, Hemker T, Dahmen G. Fungal spondylitis. A case of *Torulopsis glabrata* and *Candida tropicalis* infection. Acta Orthop Scand 1986;57:563-565.
- Buchaille L, Freydière AM, Guinet R, Gillet Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17(7):479-488.

- Buchheidt D, Skladny H, Baust C, Hehlmann R. Systemic infections with *Candida* sp. and *Aspergillus* sp. in immunocompromised patients with hematological malignancies: current serological and molecular diagnostic methods. *Chemotherapy* 2000;46(3):219-228.
- Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Banon-Clement J, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis* 1996;2(4):285-290.
- Budtz-Jørgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res* 1983;91:288-295.
- Buesching W, Kurek K, Roberto G. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1979;9:565-569.
- Burgos Revilla F, Pascual Santos J, Marcen Letosa R, Gómez Do Santos V, Sánchez-Encinas M, Escudero Barrilero A. Renal transplantation and urinary infection. Review. *Actas Urol Esp* 1999;23(2):95-104.
- Cahen P, Laurent F, Honderlick P, Saheb F. Utilization of Bichrolatex albicans test for the rapid identification of *Candida albicans* in blood culture bottles in fungemia: preliminary results from a multicenter study. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(5):512-514.
- Campbell C, Davey K, Holmes A, Szekely A, Warnock D. Comparison of the API *Candida* system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):821-823.
- Campbell C, Holmes A, Davey K, Szekely A, Warnock D. Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17(5):367-368.

- Campbell J, Zaccaria E, Baker C. Systemic candidiasis in extremely low birth weight infants receiving topical petrolatum ointment for skin care: a case-control study. *Pediatrics* 2000;105(5):1041-1045.
- Campos C, Igreja R, Campos E. Candidiasis in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med trop* 1992;25(3):165-1669.
- Cannon R, Chaffin W. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10(3):359-383.
- Carlotti A, Grillot R, Couble A, Villard J. Typing of *Candida krusei* clinical by restriction endonuclease analysis and hybridization with CkF &, 2DNA probe. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1691-1699.
- Carmody T, Kane K. *Torulopsis (Candida) glabrata* endocarditis involving a bovine pericardial xenograft heart valve. *Heart Lung* 1986;15:40-42.
- Carmona O, Gómez M, Montes T, Marcano C, Mariño F. *Microbiología Médica*, de Divo. McGraw-Hill Interamericana. 1997.
- Carrillo Muñoz A, Cárdenes C, Tur C, Rodrigo J, Arévalo P, Quindós G, del Valle O, Pemán J, Estivill D, Torres-Lana A, Pontón J. Utilidad de Bactocard® *Candida* para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* (In press).
- Carrillo Muñoz A. Contribución a la estandarización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Tesis Doctoral. Facultat de Biología. Universidad de Barcelona. 1994.
- Caruso L. Vaginal moniliasis after tetracycline therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1964;90:374-378.
- Casal M, Linares M, Solis F, Rodríguez F. Appearance of colonies of *Prototheca* on CHROMagar *Candida* medium. *Mycopathologia* 1997;137:79-82.

- Castaldo P, Stratta R, Wood R, Markin R, Patil K, Shaefer M, Langnas A, Reed E, Li S, Pillen T, *et al.* Clinical spectrum of fungal infections after orthotopic liver transplantation. *Arch Surg* 1991;126(2):149-156.
- Castellani A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. *Lancet* 1912;1:13-15.
- Cayton R, Soutar C, Stanford C, Turner G, Nunn A. Double-blind trial comparing two dosage schedules of beclomethasone dipropionate aerosol in the treatment of chronic bronchial asthma. *Lancet* 1964;2:303-307.
- Ceballos A, Gaitán L, Quindós G, Ceballos L. Presentaciones clínicas de las candidiasis orales en el paciente infectado por VIH. IV Congreso Nacional de Micología, Cádiz. *Rev Iberoam Micol* 1998;15(3):200.
- Cech P, Stalder H, Widmann J, Rohner A, Miescher P. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associated with *Candida albicans* liver abscess. *Am J Med* 1979;66:149-153.
- Chakrabarti A, Nayak N, Kumar P, Talwar P, Chari P, Panigrahi D. Surveillance of nosocomial fungal infections in a burn care unit. *Infection* 1992;20(3):132-135.
- Chakrabarti A, Reddy T, Singhi S. Does candiduria predict candidaemia?. *Indian J Med Res* 1997;106:513-516.
- Chakravarty S, Sandhu R. Incidence of bronchopulmonary candidiasis in patients treated with antibiotics. *Acta Tuberc Scand* 1964;44:152-158.
- Challacombe S. Haematological abnormalities in oral lichen planus, candidiasis, leukoplakia and nonspecific stomatitis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:72-80.
- Chander J, Sharma A. Prevalence of fungal corneal ulcers in northern India. *Infection* 1994;22(3):207-209.

- Chandler F. Pathology of the mycoses in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Curr Topics Med Mycol* 1985;1:1-23.
- Chandrasekar P, Molinari J. Oral candidiasis: forerunner of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)?. *Oral Surg* 1985;60:532-534.
- Chapman S, Daniel III C. Cutaneous manifestations of fungal infection. *Infect Dis Clin North Am* 1994;8(4):879-910.
- Chen SJ, Chung YM, Liu JH. Endogenous *Candida* endophthalmitis after induced abortion. *American J Ophthal* 1998;125(6):873-875.
- Chen Y, Chang S, Sun C, Yang L, Hsieh W, Luh K. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(5):369-375.
- Childers N, Stinnett E, Wheeler P, Wright J, Castleberry R, Dasanayake A. Oral complications in children with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75(1):41-47.
- Chiu NC, Chung YF, Huang FY. Pediatric nosocomial fungal infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28(1):191-195.
- Chocarro Martínez A, Galindo Tobal F, Ruíz-Irastorza G, González López A, Alvarez Navia f, Ochoa Sangrador C, Martín Arribas M. Risk factors for esophageal candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(2):96-100.
- Chugh K, Sakhuja V, Jain S, Talwar P, Minz M, Joshi K, Indudhara R. High mortality in systemic fungal infections following renal transplantation in third-world countries. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8(2):168-172.
- Cisneros Alonso C, Sánchez-Izquierdo Riera J, Montejo González J, Arribas López P, Martínez de la Gandara A. Infections in the postoperative period of a liver

transplant. A comparison of 2 protocols for anti-infectious prophylaxis. Rev Clin Esp 1993;192(3):112-115.

Citak M, Rees A, Mavroudis C. Surgical management of infective endocarditis in children. Am Thorac Surg 1992;54(4):755-760.

Claman H, Hartley T; Merrill D. Hypogammaglobulinaemia, primary and secondary: immunoglobulin levels (γ G γ A γ M) in one hundred and twenty five patients. J Allergy 1966;38:215-225.

Clearinghouse E. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. J Oral Pathol Med 1993;22:289-291.

Clift R. Candidiasis in the transplant patient. Am J Med 1984;77 (suppl 4D):34-38.

Clotet B, Grifol M, Parra O, Boix J, Junca J, Tor J, Foz M. Asymptomatic esophageal candidiasis in the acquired immunodeficiency syndrome related complex Ann Intern Med 1986;105:145.

Cohen B, Elin R. Enhanced resistance to certain infections in vitamin A-treated mice. Plast Reconstr Surg 1974;54:192-194.

Cohen C, Duerr A, Pruithithada N, Rugsao S, Illier S, García P, Nelson K. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. AIDS 1995;9(9):1093-1097.

Coleman D, Bennett D, Sullivan D, Gallagher P, Henman M, Shanley D, Russell R. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. Crit Rev Microbiol 1993;19(2):61-82.

Coleman D, Bennett D, Sullivan D. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS. New perspectives/new approaches. Crit Rev Microbiol 1993;19:61-82.

- Coleman D, Rinaldi M, Haynes K, Rex J, Summerbell R, Anaissie E, Li A, Sullivan D. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 1998;36 (suppl.1):156-165.
- Coleman D, Sullivan D, Bennett D *et al.* Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997;11:557-567.
- Coleman D, Sullivan D, Haynes K *et al.* Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis* 1997;3(Suppl. 1):S96-S101.
- Collins L, Samore M, Roberts M, *et al.* Risk factors for invasive fungal infections complicating orthotopic liver transplantation. *J Infect Dis* 1994;170:644.
- Colombo A, Nucci M, Salomao R, Branchini M, Richtmann R, Derossi A, Wey S. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34(4):281-286.
- Connolly J Jr, McAdams H, Erasmus J, Rosado-de-Christenson M. Opportunistic fungal pneumonia. *J Thorac Imaging* 1999;14(1):51-62.
- Contreras I, San Millán R, Agustín-Barrasa A, Pontón J, Quindós G. Utility of Albicans ID plate for rapid identification of *Candida albicans* in clinical samples. Rapid identification of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1996;136(1):17-20.
- Cooper B, Johnson J, Thaxton E. Clinical evaluation of the Uni-Yeast-Tek system for rapid presumptive identification of medically important yeasts. *J clin Microbiol* 1978;7(4):349-355.
- Cooper B, Silva-Hunter M. Yeasts of medical importance. *Manual Clin Microbiol*. Fourth ed. 1985. pp526-541.

- Cormane R, Goslings W. Factors influencing the growth of *Candida albicans* (*in vivo* and *in vitro* studies). *Sabouraudia* 1963;3:52-63.
- Crespo-Erchiga V, de Luis B, Delgado V, Crespo A, Vera A. Espectro etiológico de las onicomycosis en nuestro medio. *Rev Iberoamer Micol* 1994;11:pp s20.
- Crislip M, Edwards J. Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 1989;3:103-133.
- Crist A Jr, Dietz T, Kampschroer K. Comparison of the Murex *C. albicans*, Albicans-Sure and BactiCard *Candida* test kits with the germ tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2616-2618.
- Crist A, Johnson L, Burke J. Evaluation of the microbial identification system for identification of clinically isolated yeasts. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2408-2410.
- Critchley I, Douglas L. Differential adhesion of pathogenic *Candida* species to epithelial and inert surfaces. *FEMS Microbiol. Newsletter* 1985;28:199-203.
- Crook W. *The yeast connection*. New York, Vintage Books 1986.
- Cross A, Alving B, Sadoff J, Baldwin P, Terebelo H, Tang D. Intravenous immune globulin: a cautionary note. *Lancet* 1984;1:912.
- Cruickshank R, Sharman A. Biology of vagina in human subject: vaginal discharge of non-infective origin. *J Obstet Gynecol Br Emp* 1934;41:369-384.
- Curry C, Cuie P. Fungal septicaemia in patients receiving parenteral hyperalimentation. *New Engl J Med* 1971;285:1221-1225.
- Cu-Uvin S, Flanigan T, Rich J, Mileno M, Mayer K, Carpenter C. Human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome among North American women. *Am J Med* 1996;101(3):316-322.

- Czirók E, Prinz G, Dénes R, Reményi P, Herendi A. Value of surveillance cultures in a bone marrow transplantation unit. *J Med Microbiol* 1997;46:785-791.
- Dade Behring. MicroScan®. Manual de utilización de panel para la identificación rápida de levaduras. 1998.
- Dalton M, Haldane D, MacDonald J. Rapid identification of *Candida albicans* using 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -galactosaminide. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12(6):521-3.
- Daniel III C, Norton L, Scher R. The spectrum of nail disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:93-97.
- Darouiche R, Safar H, Raad Y. *In vitro* efficacy of antimicrobial-coated bladder catheters in inhibiting bacterial migration along catheter surface. *J Infect Dis* 1997;176:1109-1112.
- Dastidar S. Studies on the antigens of genus *Candida* by gel diffusion. *Indian J Med Res* 1968;56:247-249.
- Date A, Chandy M, Pulimood B. Filariar chyluria with opportunistic infections. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983;77:112-113.
- Davey K, Chant P, Downer C, Campbell C, Warnock D. Evaluation oh the AUXACOLOR system, a new method of clinical yeast identification. *J Clin Pathol* 1995;48(9):807-809.
- David H, Jahan M. β -glucosidase activity in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1977;5:383-384.
- Davis B. Vaginal moniliasis in private practice. *Obstet Gynecol* 1969;34:40-45.
- De Champs C, Lebeau B, Grillot R, Ambroise-Thomas P. Evaluation of Albicans ID plates. *J Clin Microbiol* 1995;33:2227-2228.

- De Gentile L, Bouchara J, Le Clec'h C, Cimon B, Symoens F, Chabasse D. Prevalence de *Candida ciferrii* in elderly patients with trophic disorders of the legs. *Mycopathologia* 1995;131:99-102.
- De Graciansky P, Leclec R. Delaporte J, Gouin de Roumilly P. Influence des carences (déficiencias) sur l'infection expérimentale á *Candida albicans* sur rat blanc. *Sem Hóp Paris* 1957;33:273.
- De Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. *Haematologica* 2000;85(1):88-93.
- De Rom R, Thiery M, Mountauban Van Swijdregt L, Daskalides J. Le metronidazole. *Chimiotherapie orale de la Trichomoniasis vaginale. Bruxelles-Med* 1961;41:349-355.
- Dealler S. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1991;29(5):1081-1082.
- Dedic A, Masic I. Diabetes mellitus and *Candida albicans*. *Med Arh* 1999;53(1):43-45.
- Deeb E, Natsios G. Contamination of in-use hyperalimentation solutions. *New Engl J Med* 1972;286:613.
- Dennis M, Itkin I. Effectiveness and complications of aerosol dexamethasone phosphate in severe asthma. *J Allerg* 1964;35:70-76.
- Dermoumi H. Differentiation of yeastlike fungi isolated from clinical specimens with the Yeast-Tek plate. *Mykosen* 1982;25(12):697-701.
- Di Febo G, Miglioli M, Calo G, Biasco G, Luzzza F, Gizzi G, Gipollini F, Rossi A, Barbara L. *Candida albicans* infection of gastric ulcer. Frequency and correlation with medical treatment. *Dig Dis Sci* 1985;30:178-181.

- Di Silverio A, Brazzelli V, Brandozzi G, Barbarini G, Maccabruni A, Sacchi S. Prevalence of dermatophytes and yeasts (*Candida* spp., *Malassezia furfur*) in HIV patients. *Mycopathologia* 1991;114:103-107.
- Diddle A, Gardner W, Williamson P, O'Connor K. Oral contraceptive medications and vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 1969;34:373-377.
- Digenis G, Abraham G, Savin E, Blake P, Dombros N, Sombolos K, Vas S, Mathews R, Oreopoulos D. Peritonitis-related deaths in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients. *Perit Dial Int* 1990;10(1):45-47.
- Dismukes W. Epidemiology of opportunistic systemic mycoses. *Curr Med Res and Opinion* 1991;12:1-14.
- Dixon D, Rhodes J, Fromtling R. Taxonomy, classification, and morphology of the fungi. En Murray P, Baron E, Pfaller M, Tereover F, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology* ASM Press 1999. pp 1161-1166.
- Dixon P, Warin R, English M. Alimentary *Candida albicans* and napkin rashes. *Br J Dermatol* 1972;86:158-162.
- Dixon P, Warin R, English M. Role of *Candida albicans* infection in napkin rashes. *Br Med J* 1969;2:23-27.
- Dolan C, Irke D. Further studies of the germ-tube for test for *Candida albicans* identification. *Am J Clin Pathol* 1971;55:733-734.
- Doleans F. A new approach in bacteriology with chromogenic media. *Microbiologia* 1994;10(1-2):195-202.
- Dooley DP, Beckius M, Jeffrey BS. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2889-2892.

- Douglas L. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. *Microbial Sci* 1985;2:243-247.
- Drake T, Hindler J, Berlin O, Bruckner D. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex inculture using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1987;25:1442-1445.
- Dromer F, Ronin O, Improvisi L, Dupont B. Utilité et limites du Bichro-latex *albicans*® pour l'identification rapide de *Candida albicans*. *J Mycol méd* 1996;6:91-92.
- Dronova O, Smolianskaia A. Mycoses in oncologic patients. *Antibiot Khimioter* 1994;39(4):45-47.
- Drouet M. Allergie cutanie á *Candida albicans*. *Allergie Immunol* 1985;17:13-18.
- Duerr A, Sierra M, Feldman J, Clarke L, Ehrlich I, DeHovitz J. Immune compromise and prevalence of *Candida* vulvovaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* 1997;90(2):252-256.
- Dupont B, Denning D, Marriot D, Sugar A, Viviani M, Sirisanthara T. Mycoses in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1994;32(Suppl 1):65-77.
- Dupont B, Ronin O, Cohen M, Kervroedan P, Lavarde V. Evaluation of a colorimetric auxanogram system for yeast identification (Comunication affichée). 5th European Congress of Clin Microbiol Inf Dis/Oslo 1991.
- Dupont PF. *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J American Podiatric Medical Association* 1995;85(2):104-115.
- Edgeworth J, Treacher D, Eykyn S. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27(8):1421-1428.
- Editorial. Vaginitis and the pill. *J Am Med Assoc* 1966;196:731-732.

- Edmond M, Wallace S, McClish D, Pfaller , Jones R, Wenzel R. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999;29(2):239-244.
- Ehrlich H, Gelfand D, Saiki R. Specific DNA amplification. Nature 1988;331:461-472.
- Eisenstein B. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990;322:178-183.
- Ekenna O, Sherertz R, Bingham H. Natural history of bloodstream infections in a burn patient population: the importance of candidemia. Am J Infect Control 1993;21(4):189-195.
- Elder B, Roberto G. Rapid methods for the diagnosis of fungal infections. Lab Med 1986;17:591-596.
- Elewski B. Cutaneous mycoses in children. Brithish J Dermatol 1996;134(suppl 46):7-11.
- El-Falaky Y, Shoukry H. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by polymorphonuclear leukocytes in thalassemia. J Egypt Public Health Assoc 1977;2:317-329.
- Ellis D, Davis S, Alexiou H, Pfeiffer T, Manatakis Z. Descriptions of Medical QAP fungi. Pfizer, congreso de la ISHAM. Australia 1992.
- Ellis D. Clinical Mycology: The human oportunistc mycoses. Pfizer, congreso de la ISHAM. Australia 1994.
- Elmets C. Management of common superficial fungal infections in patients with AIDS. J Am Acad Dermatol 1994;31:S60-S63.

- El-Zaatari M, Pasarell L, McGinnis M, Buckner J, Land G, Salkin I. Evaluation of the updated Vitek Yeast Identification data base. *J Clin Microbiol* 1990;28(9):1938-1941.
- Engvall E, Perlman P. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-874.
- Eschenbach D, Hillier S, Critchlow C, Stevens C, De Rouen T, Holmes K. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:819-828.
- Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J. Comparison of RapID Yeast Plus System with API 20C system for identification of common, new and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):883-886.
- Eversole L, Jacobsen P, Stone C, Freck-Leton V. Oral condyloma planus (hairy leukoplakia) among homosexual men: a clinicopathologic study of thirty six cases. *Oral Surg* 1986;16:249-255.
- Eyre J, Nally F. Oral candidosis and carcitroma. *Br J Dermatol* 1971;85:73-75.
- Faergemann J. The role of yeasts in onychomycosis. *Mycoses* 1996;39:223-224.
- Faix R. Systemic *Candida* infections in infants in intensive care nurseries – high incidence of central nervous system involvement. *J Pediatr* 1984;105:616-622.
- Fardan A, Nutt G. Oral Candida, debilitating disease and atrophic lesions of the tongue. *J Biol Buccale* 1976;4:203-226.
- Farman A. Atrophic lesions of the tongue among diabetic outpatients: their incidence and regression. *J Oral Pathol* 1977;6:396-400.

- Fauci A, Macher A, Longo D, Lane H, Rook A, Masur H, Gelman E. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1984;100:92-106.
- Fearon J, Yu J, Bartlett S, Munro I, Chir B, Whitaker L. Infections in craniofacial surgery: a combined report of 567 procedures from two centers. *Plast Reconstr Surg* 1997;100(4):862-868.
- Fenn JP, Billetdeaux E, Segal H, Skodack-Jones L, Padilla P, Bale M, Carroll K. Comparison of four methodologies for rapid and cost-effective identification of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3387-3389.
- Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carroll K. Comparison of updated Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994;32 (5):1184-1187.
- Fenn JP, Segal H, Blevins L, Fawson S, Newcomb-Gayman P, Carroll K. Comparison of the MUREX *Candida albicans* CA50 test with germ tube production for identification of *C. albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;24(1):31-35.
- Fennema J, van Ameijden E, Coutinho R, van den Hoek A. HIV, sexually transmitted diseases and gynaecological disorders in women: increased risk for genital herpes and warts among HIV-infected prostitutes in Amsterdam. *AIDS* 1995;9:1071-1078.
- Ferrari F, Pagani A, Marconi M, Stefanoni R, Siccardi A. Inhibition of candidacidal activity of human neutrophil leukocytes by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:87-88.

- Fetter A, Partisani M, Koenig H *et al.* Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV-infection: frequency and predisposing factors. *J Oral Pathol Med* 1993;22:57-59.
- Finkelstein R, Reinhertz G, Hashman N, Merzbach D. Outbreak of *Candida tropicalis* fungemia in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14:587-590.
- Fisher B, Warner L. Cutaneous manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Dermatol* 1987;26:615-630.
- Fisher F, Cook N. *Fundamentals of diagnostic Mycology*. W B Saunders Company 1998.
- Fitzpatrick J, Topley H. Ampicillin therapy and *Candida* outgrowth. *Am J Med Sci* 1966;252:310-313.
- Fleischmann J, Church J, Lehrer R. Primary *Candida* meningitis and chronic granulomatous disease. *Am J Med Sci* 1986;291:334-341.
- Fletcher J, Mather J, Lewis M, Whiting G. Mouth lesions in iron-deficient anaemia: relationship to *Candida albicans* in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. *J Infect Dis* 1975;131:44-50.
- Folb P, Trounce J. Immunological aspects of *Candida* infection complicating steroid and immunosuppressive drug therapy. *Lancet* 1970;2:1112-1114.
- Forsythe W, Brandt J, Lewis J. Comparative study of Vitek YBC system and API20C for identification of clinical yeast isolates, abstr. C-155, p. 369. Abstr. 90th Annu Meet Am Soc Microbiol 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990.

Fowler S, Rhoton B, Springer S, Messer S, Hollis R, Pfaller M. Evidence for person-to-person transmission of *Candida lusitanae* in a neonatal intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19(5):343-345.

Fraser V, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan W. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992;15:415-421.

Freeman J, Lemie A, Maclean L. Intravenous alimentation and septicaemia. *Surg Gynecol Obstet* 1972;135:708-712.

Freund U, Gimmon Z, *et al.* *Candida* infected ascites caused by perforated ulcer. *Mycopathologia* 1979;66:191-192.

Freydière AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:465-467.

Freydière AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *Candida krusei* colonies. *J Clin Microbiol* 1997;35 (4):877-880.

Freydière AM, Gille Y. Yeasts: appearance of colonies on CHROMagar Candida. Abstr MS-1/22, p 323. In Abstracts of the 7th International Congress of Mycology Division. International Union of Microbiological Societies, Praga, República de Checoslovaquia 1994.

Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:85-89.

Freydière AM. Evaluation of CHROMagar; *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996;34:2048.

- Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Kervroedan P, Faure O, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Auxacolor, a new commercial system for yeast identification: evaluation of 182 strains comparatively with ID 32C. *Ann Biol Clin* 1995;53:221-225.
- Fricker-Hidalgo H, Monget D, Lebeau B, Babolat M, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Rapid identification of *Candida albicans*: evaluation of "Rapidec albicans". Study of 444 yeast strains. *Ann Biol Clin (Paris)* 1992;50(2):103-106.
- Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, Lebeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1846-1848.
- Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499-511.
- Friedland I. Bacteraemia in severely malnourished children. *Ann Trop Paediatr* 1992;12(4):433-440.
- Frieland G, Saltzman B, Rogers M, Kahl P, Lesser M, Mayers M, Klein R. Lack of transmission of HTLV-III/LAV infection to household contacts of patients with IDS or AIDS related complex with oral candidiasis. *New Engl J Med* 1986;314:344-348.
- Fromtling R. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:187-217.
- Frost K, Sutherland-Campbell H, Plunkett O. Monilia of the tongue: report of an instance with associated skin lesions (moniliatid?). *Arch Dermatol Syph* 1929;20:811-819.
- Fruit J, Lebeau B, Dessuant H, Grillot R, Vernes A. Evaluation of Albicans ID, a ready to use medium for the isolation and identification of *Candida albicans*.

1993; abstr. 450,145. Abstr 6th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis, Seville, Spain.

Fuchs P, Dolan C. Performance of yeast identification systems. An analysis of the College of American Pathologists Special Mycology Survey data. *Am J Clin Pathol* 1982;78(4 Suppl):664-667.

Fukazawa Y, Shinoda T, Tsuchiya T. Response and specificity of antibodies for *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1968;95:754-763.

Fuks J, Patel H, Hornedo J, Van Echo D, Moody M, Aisner J. Infections in patients with intensive induction chemotherapy. *Med Pediatr Oncol* 1986;14:255-261.

Fumouze Diagnostics. Krusei-Color® Fumouze. 1995 .

Furuta I, Obana Y, Yamazumi T, Ohba Y, Kimura M, Suzuki T, Hashimoto S. Retrospective analysis of deep-seated candidiasis among cases autopsied between 1982 to 1991. *Kansenshogaku Zasshi* 1994;68(7):879-886.

Gabriel-Bruneau S, Guinet R. Antigenic relationships among *Candida* species studied by crossed-line immunoelectrophoresis: taxonomic significance. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:227-236.

Galask R. Vaginal colonization by bacteria and yeast. *Am J Obstet Gynecol* 1989;158:993-995.

Galbraith A, McCarthy J, Tesar P, McGiffin D. Cardiac transplantation for prosthetic valve endocarditis in a previously transplanted heart. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(8):805-806.

Galen. De remediis parabilibus I-III. Aprox. 130 D.C. En Kuhn CG, ed. *Opera Omnia*. Hildesheim: George Olms, 1965.

- Gales A, Pfaller M, Houston A, Joly S, Sullivan D, Coleman D, Soll D. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):3804-3808.
- Gallach C, Torres Rodríguez J, Madrenys Brunet N. A technic for rapid identification of yeasts: the seroagglutination method. *Med Clin* 1989;93(10):397.
- Gallach M.C. Valoracio del serotipatge i biotipatge de soques de *Candida* en el diagnostic i l'epidemiologia de la candidiasis. Tesina de licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. 1989.
- Gallis H, Berman R, Cate T, Hamilton J, Gunnells J, Morales C, Prat J. Candidiasis vaginales: Estudio clínico microbiológico. *Infec Microbiol Clin* 1985;3:22-28.
- García López J, Pérez L, Aller A, Aretio R, Gutiérrez M, Martín Mazuelos E. Evaluación de un nuevo medio para el cultivo de levaduras (abstr 144). In Libro de resúmenes de la V Reunión Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valladolid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 1993.
- García-Martos P, García-Agudo R, Hernández Molina JM, Marín P, Tallero E, Mira J. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:131-135.
- García-Martos P, Mira Gutiérrez J, Galan Sánchez F, Hernández Molina JM. Utilidad del medio de cultivo CHROMagar *Candida* en la diferenciación e identificación presuntiva de levaduras de interés clínico. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1997;15(2):70-72.
- Gardner H, Kaufman R. Candidiasis. In *Benign Diseases of the Vulva and Vagina*. St Louis, MO, Mosby 1969. pp 217-242.

- Gauto A, Law E, Holder I, Macmillan B. Experience with amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in burn patients. *Am J Surg* 1977;133:174-178.
- Geiger A, Foxman B. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students. *Epidemiology* 1996;7(2):182-187.
- Gentles J.C, La Touche C.J. Yeasts as human and animal pathogens. In Rose AH y Harrison JS, eds. *The yeast*. London: Academic Press 1969;1:108-182.
- George D, Arnow P, Fox A, Thistlethwaite J, Emond J, Broelsch C, Whittington P. Patterns of infection after pediatric liver transplantation. *Am J Dis Child* 1992;146(8):924-929.
- Gerson S. Oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990;1(3):153-166.
- Giamarellou H, Antoniadou A. Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17(8):558-564.
- Ginter G, Soyer H, Rieger E. Vaginal yeast colonization and promiscuity. A study of 197 prostitutes. *Mycoses* 1992;35(7-8):177-180.
- Giombetti R, Hagstrom J, Landey S, Young M, New M. Cushing's syndrome in infancy. A case complicated by monilial endocarditis. *Am J Dis Child* 1971;122:264-266.
- Girishkumar H, Yousuf A, Chivate J, Geisler E. Experience with invasive *Candida* infections. *Postgrad Med J* 1999;75(881):151-153.
- Giudice M, Lian Y, Andrade T, Papalrdo M, Silva A, Mendes-Gianini M. Micosis cutáneas en pacientes portadores del virus HIV. Aspectos clínico-terapéuticos y laboratoriales. *Rev Iberoamer Micol* 1994;11:pp S-37.

- Giunchi G. Candidosis following antibiotic therapy. *Sci Med Ital (edic inglesa)* 1958;6:580-628.
- Giusiano GE, Mangiaterra ML. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROMagar *Candida*. *Rev Arg Iberoam* 1998;30(2):100-103.
- Gladdy R, Richardson S, Davies H, Superina R. *Candida* infection in pediatric liver transplant recipients. *Liver Transpl Surg* 1999;5(1):16-24.
- Glasmacher A, Hahn C, Molitor E, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Marklein G. Fungal surveillance cultures during antifungal prophylaxis with itraconazole in neutropenic patients with acute leukaemia. *Mycoses* 1999;42(5-6):395-40.
- Gmelin J. Carl von Linné *Systema natura per regna tria nature*. 1791;2:1487.
- Goenka M, Kochhar R, Chakrabarti A, Kumar A, Gupta O, Talwar P, Mehta S. *Candida* overgrowth after treatment of duodenal ulcer. A comparison of cimetidine, famotidine, and omeprazole. *J Clin Gastroenterol* 1996;23(1):7-10.
- Goldschmied-Reouven A, Block C. Yeasts isolated from blood cultures at a large israeli general hospital, 1983-1990. XI ISHAM Congress. Montreal, Canadá 1991. pp 98.
- Goldstein S. Advances in the treatment of superficial *Candida* infections. *Seminars in Dermatology* 1993;4(12):315-330.
- Goodwin S, Fiedler-Kelly J, Grasela T, Schell W, Perfect J. A nationwide survey of clinical laboratory methodologies for fungal infections. *J Med Vet Mycol* 1992;30(2):153-160.
- Gottlieb M, Schroff R, Schanker H, Weisman J, Fan P, Wolf R, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in a previously healthy homosexual men *New Engl J Med* 1981;305:1425-1431.

- Gottlieb-Jensen K, Andersen J. Occurrence of *Candida* in gastric ulcer. Significance for the healing process. *Gastroenterology* 1983;85:535-537.
- Gouello J, Asfar P, Brenet O, Kouatchet A, Berthelot G, Alquier P. Nosocomial endocarditis in the intensive care unit: an analysis of 22 cases. *Crit Care Med* 2000;28(2):377-382.
- Gow N. Germ tube growth of *Candida albicans*. *Current Topics in Medical Mycology* 1997;8(1-2):43-55.
- Gozdasoglu S, Ertem M, Buyukkececi Z, Yavuzdemir S, Bengisun S, Ozenci H, Tacyildiz N, Unal E, Yavuz G, Deda G, Aysev D. Fungal colonization and infection in children with acute leukemia and lymphoma during induction therapy. *Med Pediatr Oncol* 1999;32(5):344-348.
- Granato P, Franz M. Use of the Gen-Probe PACE system for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital samples. *Diag Microbiol Infect Dis* 1990;13:217-221.
- Grawitz P. Zur Botanik des Soors und der Dermatomycozes. *Dtsch Z Prakt Med* 1877. pp 209-211.
- Gray L, Roberts G. Identification of medically important yeasts. *Clin Microbiol Newsletter* 1988;10:73-77.
- Greer C, Peterson S, Kiviat N, Manos M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of tixative and fixation time. *Am J Clin Path* 1991;95:117-124.
- Grillot R. Les mycoses humaines: démarche diagnostique. Paris, Elsevier 1996.
- Gruby D. Recherches anatomiques sur une plante eryptogame qui constituae le vrai muguet des enfants. *C R Acad Sci (Paris)* 1842;14:634-636.

- Grudeva-Popova J, Goranov S. Mucocutaneous infections in hematological malignancies. *Folia Med (Plovdiv)* 1999;41(3):40-44.
- Guarro J, Gené J, Stchigel A. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(3):454-500.
- Guggenheimer J, Moore P, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo M, Block H, Weyant R, Orchard T. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89(5):570-576.
- Gumbo T, Isada C, Hall G, Karafa M, Gordon S. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. *Medicine (Baltimore)* 1999;78(4):220-227.
- Gupta P, Faridi M, Rawat S, Sharma P. Clinical profile and risk factors for oral candidosis in sick newborns. *Indian Pediatr* 1996;33(4):299-303.
- Gustke K, Wu K. *Torulopsis glabrata* osteomyelitis: report of a case. *Clin Orthopaedics* 1981;154:197-200.
- Gutiérrez J, Martín E, Lozano C, Coronilla J, Nogales C. Evaluation of the ATB 32 C, automicrobic system and API 20 C using clinical yeast isolates. *Ann Biol Clin* 1994;50:443-446.
- Haley L, Callaway C. *Laboratory Methods in Medical Mycology* 4th ed. U.S. Department of Health, Education, and Welfare (HEW). HEW publication no. (CDC) 78-8361. Atlanta, GA: Public Health Service, Center for Disease Control, Laboratory Training and Consultation Division 1978.
- Haley L. Identification of yeasts in clinical microbiology laboratories. *Am J Med Technol* 1971;37:125-131.
- Haley L. Yeast infections of the lower urinary tract. *Sabouradia* 1965;4:98-105.

- Hall G, Pratt-Rippin K, Washington H. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *histoplasma capsulatum* isolates. J Clin Microbiol 1992;30:3003-3004.
- Hankins C, Handley M. HIV disease and AIDS in women: current knowledge and a research agenda. J Acquir Immune Defic Syndr 1992;5(10):957-971.
- Hansson C, Jekler J, Swanbeck G. *Candida albicans* infections in leg ulcers and surrounding skin after the use of ointment impregnated stockings. Acta Derm Venereol 1985;65:424-427.
- Hantschnke D. Differentiation of yeast-like fungi using the commercial Auxacolor system. Mycoses 1996;39:135-140.
- Harden J, Kemp L, Mirtallo J. Femoral catheters increase risk of infection in total parenteral nutrition patients. Nutr Clin Pract 1995;10(2):60-66.
- Harms K, Herting E, Schiffmann J, Speer C. *Candida* infections in premature infants weighing less than 1,500 g. Mucocutaneous colonization and incidence of systemic infections. Monatsschr Kinderheilkd 1992;140(9):633-638.
- Hartman P. Miniaturized microbiological methods. Academic Press, Inc, New York, N Y. 1968.
- Hase M, Radden B, Reade P. *Torulopsis glabrata* infection in the oral cavity. J Oral Pathol 1976;5:8-16.
- Hasenclever H, Mitchell W. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J Bact 1961;82:570-573.
- Hasenclever H. The in vitro interactions of *Candida albicans* with nonspecific serum proteins. Mycopathol 1977;65:169-176.

- Hasyn J, Buckley H. Evaluation of the AutoMicrobic system for identification of yeasts. *J Clin Microbiol* 1982;16(5):901-904.
- Hausmann D. Parasites des organes sexuels femelles de l'homme et de quelques animaux avec une notice sur developpement d'*oidium albicans*. Robin Paris, J B Bailliere 1975.
- Hazen K, Theisz G, Howell S. Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):824-827.
- Heckmann J, Kraus J, Niedermeier W, Erbguth F, Druschky A, Schoerner C, Neundorfer B. Nosocomial pneumonias in a neurology intensive care unit. *Dtsch Med Wochenschr* 1999;124(31-32):914-924.
- Héctor R, Lyon F, Domer J. Immunological relatedness among *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *Infect Immun* 1981;34:844-850.
- Hedden D, Buck J. A reemphasis-germ-tubes diagnostic for *Candida albicans* have no constrictions. *Mycopathol* 1980;70:95-101.
- Heelan J, Siliezar D, Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1996;34(11):2847-2849.
- Heelan J, Sotomayor E, Coon K, D'Arezzo J. Comparison of the rapid yeast plus panel with the API20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1998;36(5):1443-1445.
- Heffner D, Franklin W. Endocarditis caused by *Torulopsis glabrata*. *Am J Clin Pathol* 1978;70:420-423.
- Heinig M, Francis J, Pappagianis D. Mammary candidosis in lactating women. *J Hum Lact* 1999;15(4):281-288.

- Henseler T. Mucocutaneous candidiasis in patients with skin diseases. *Mycoses* 1995;38 (Suppl 1):7-13.
- Herling I, Kotler M, Segel B. *Candida parapsilosis* endocarditis without predisposing cause. *Int J Cardiol* 1984;5:753-756.
- Herrod H. Chronic mucocutaneous candidiasis in childhood and complications of non-*Candida* infection: a report of the Pediatric Immunodeficiency Collaborative Study Group. *J Pediatr* 1990;116(3):377-382.
- Herruzo Cabrera R, García González J, García Magan P, del Pino Gil Mateo M, Gómez Antúnez M, del rey Calero J. Nosocomial infection and its impact on the stay in a neonatal intensive care unit (1988-1991). *Rev Sanid Hig Publica (Madr)* 1993;67(2):153-163.
- Hesse U, Sutherland D, Najaria J, Simmons R. Intra-abdominal infections in pancreas transplant patients. *Ann Surg* 1986;203:153-162.
- Hicks C. Syphilis and HIV infection. *Dermatol Clin* 1991;90:493-501.
- Hicks M, Carter A, Rossmann S, Demmler G, Simon C, Cron S, Flaitz C, Shearer W, Kline M. Detection of fungal organisms in saliva from HIV-infected children: a preliminary cytologic analysis. *Pediatr Dent* 1998;20:162-168.
- Hidalgo J, Alangaden G, Elliott D, Akins R, Puklin J, Abrams G, Vazquez J. Fungal endophthalmitis diagnosis by detection of *Candida albicans* DNA in intraocular fluid by use of a species-specific polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2000;181(3):1198-1201.
- Hillier S, Krohn M, Klebanoff S, Eschenbach D. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet Gynecol* 1992;79:369-373.

- Hilton A, Warnock D. Vaginal candidiasis and the role of the digestive tract as a source of infection. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82:922-926.
- Hippocrates. *Epidemics*, book 3. (Aprox. 460-377 A.C). Traducido por Adams F. Baltimore: Williams & Wilkins, 1939.
- Holmes A, Cannon R, Shepherd M, Jenkinson H. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:228-231.
- Holt R, Newman R. *Candida* in the feces of children receiving tetracycline and phenoxymethyl penicillin. *J Clin Pathol* 1967;20:80-83.
- Holti G. *Candida* allergy. In: Winner H, Hurkey R (eds.) *Symposium on Candida infections*. Livingstone, Edinburgh 1966. pp 73-81.
- Hoog G de, Smith M, Weijman A. The expanding realm of yeast-like fungi, Elsevier Sci Publ (eds). Amsterdam 1987. pp 510.
- Hoog G, Guarro J. *Atlas of Clinical Fungi*. 1995.
- Hoppe J, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(3):188-191.
- Horn R, Wong B, Kiehn T, Armstrong D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset and results of therapy. *Rev Infect Dis* 1985;7:645-655.
- Hosen H. Id reactions from local fungus infections treated by immunological methods. *Tex Med* 1973;69:83-85.
- Houang Ets, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol* 1997;50:563-565.

- Hrmová M, Drobica L. Induction of mycelial type of development in *Candida albicans* by low glucose concentration. *Mycopathol* 1981;76:83-96.
- Huang Y, Li C, Lin T, Lien R, Chou Y, Wu J, Hsueh C. Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17(9):819-822.
- Huang Y, Lin T, Leu H, Peng H, Wu J, Chang H. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999;27(2):97-102.
- Huang Y, Lin T, Peng H, Wu J, Chang H, Leu H. Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1998;30(2):137-142.
- Hummel M, Thalman U, Jautzke G, Staib F, Seibold M, Hetzer R. Fungal infections following heart transplantation. *Mycoses* 1992;35(1-2):23-34.
- Hung C, Chen Y, Chang S, Luh K, Hsieh W. Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996;95(1):19-28.
- Huppert M, Harper G, Sun S, Delanerolle V. Rapid methods for identification of yeasts. *J Clin Microbiol* 1975;2(1):21-34.
- Huttova M, Kralinsky K, Horn J, Marinova I, Iligova K, Fric J, Spanik S, Filka J, Uher J, Kurak J, Krcmery V Jr. Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children--report of 10 cases. *Scand J Infect Dis* 1998;30(5):485-487.
- Innovative Diagnostic Systems, L.P. RapID Yeast Plus System. Insert#Y0.104/95. Catalog #1-1007. Innovative diagnostics Systems, L.P., Norcross. Ga 1995.
- Irobi J, Schoofs A, Goossens H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment

length polymorphism analysis of its DNA. Mol Cell Probes 1999;13(6):401-406.

Iween P, Kelly D, Reed E, Hinrichs S. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients nor treated with fluconazole. Clin Infec Dis 1995;20(2):342-347.

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(2):321-326.

Jackson J, Spain W. Comparative study of combined and sequential antiovolutory therapy on vaginal moniliasis. Am J Obstet Gynecol 1968;101:1134-1135.

Jacobs L, Skidmore E, Freeman K, Lipschultz D, Fox N. Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients. Clin Infect Dis 1996;22:30-35.

Jacobs L. Fungal urinary tract infections in the elderly:treatment guidelines. Drugs Aging 1996;8:89-96.

Jaffe H, Bregman D, Selik R. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1000 cases. J Infect Dis 1983;148:339-345.

Jandrlic M, Kalenic S, Labar B, Nemet D, Jakic-Razumovic J, Mrcic M, Plecko V, Bogdanic V. An autopsy study of systemic fungal infections in patients with hematologic malignancies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14(9):768-774.

Janssen R, Satten G, Stramer S, *et al.* New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. J Am Med Assoc 1998;280:42-48.

- Jenner B, Landau L, Pheland P. Pulmonary candidiasis in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1979;54:555-556.
- Jing W. A retrospective survey of mucocutaneous manifestations of HIV infection in Malaysia: analysis of 182 cases. *J Dermatol* 2000;27(4):225-232.
- Joachim H, Polayes S. Subacute endocarditis and systemic mycosis (*Monilia*). *J Am Med Assoc* 1940;115:205-208.
- Johnston B, Schlech W 3rd, Marrie T. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis following cardiac surgery. *J Hosp Infect* 1994;28(2):103-112.
- Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll D. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:1035-1044.
- Jonsen J. Serological studies in fungi. Comparison of agglutinins and precipitins in anti-*Candida* sera. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1955;16:792-797.
- Jose D. Treatment of chronic mucocutaneous candidiasis by lymphocyte transfer factor. *Aus N Z J Med* 1975;5:318-323.
- Joshi K, Bremner D, Gavin J, Herdson P, Parr D. The formation of germ tubes by *Candida albicans* in sheep serum and trypticase soya broth. *Am J Clin Pathol* 1973;60:839-842.
- Joy M. Oral candidiasis and AIDS. *New Engl J Med* 1984;311:1378-1379.
- Joynton D, Walker D, Jacob A, Dolby A. Defect of cell-mediated immunity in patients with iron deficiency anemia. *Lancet* 1972;2:1058-1059.

- Kabe J, Aoki Y, Ishizaki T, Miyamoto T, Nakazawa H, Tomaru M. Relationship of dermal and pulmonary sensitivity to extracts of *Candida albicans*. *Am Rev Resp Dis* 1971;104:348-357.
- Kaben U, Neumann G Do sex steroids, amniotic fluid and lochial secretions favor the growth of *Candida albicans* y *Torulopsis glabrata*. *Wiss Z Univ Rostock. Math Naturwiss Reihe* 1970;19:707-713.
- Kamma J, Nakou M, Baehni P. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999;34(1):25-33.
- Kanda M, Moriyama M, Ikeda M, Kojima S, Tokunaga M. A statical survey of deep mycoses in Japan, with particular reference to autopsy cases of cryptococcosis. *Acta Pathol Jpn.* 1974;24:595-609.
- Kandhari K.C, Pasricha J. S, Dugall S.K, Pandhi R.K. Investigation into the causation of increases susceptibility of diabetics to cutaneous infections. *Indian J Med Res* 1969;57:1295-1302.
- Kane J, Krajden S, Summerbeli R. *Torulopsis*: still legitimate name for medically important yeast. *Can Med Assoc J* 1986;135:274-275.
- Kao A, Brandt M, Pruitt W, Conn L, Perkins B, Stephens D, Baughman W, Reingold A, Rothrock G, Pfaller M, Pinner R, Hajjeh R. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29(5):1164-1170.
- Kaplan M, Sadick N, McNutt N, *et al.* Dermatologic findings and manifestations of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Am Acad Dermatol* 1987;16:485-506.
- Karabanis A, Hill C, Leclerq B, Tancrede C, Baume D, Andremont A. Risk factors for candidemia in cancer patients: a case-control study. *J Clin Microbiol* 1988;26:429-432.

- Karlowicz M, Giannone P, Pestian J, Morrow A, Shults J. Does candidemia predict threshold retinopathy of prematurity in extremely low birth weight (≤ 1000 g) neonates?. *Pediatrics* 2000;105(5):1036-1040.
- Katz R, Fischmann A, Galotto J, Guccio J, Higgins G, Ortega L, West W, Recant L. Necrolytic migratory erythema, presenting as candidiasis, due to a pancreatic glucagonoma. *Cancer* 1979;44:558-563.
- Kauffman C. Fungal infections. *Clin Geriatr Med* 1992;8(4):777-791.
- Kay H, Watson J, Jameson B, Morgen-Stern G, Powles R. Infections after bone marrow transplantation using cyclosporine. *Transplantation* 1983;36:491-495.
- Kellogg J, Bankert D, Chaturvedi V. Variation in Microbial identification system accuracy for yeast identification depending on commercial source of Sabouraud dextrose agar. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):2080-2083.
- Kerr C, Perfect J, *et al.* Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 1983;99:334-337.
- Kesson A, Sorrell T. Human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993;7(1):45-74.
- Khadilkar V, Tudehope D, Fraser S. A prospective study of nosocomial infection in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health* 1995;31(5):387-391.
- Kiehn T, Edwards F, Tom D, Lieberman G, Bernard E, Armstrong D. Evaluation of the Quantum II yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1985;22(2):216-219.
- Kim M, Rodey G, Good R, Chilgren R, Quie P. Defective Candidacidal capacity of polymorphonuclear leukocytes in chronic granulomatous disease of childhood. *J Pediatr* 1969;75:300-303.

- Kinirons M. Candidal invasion of dentine complicating hypodontia. *Br Dent J* 1983;154:400-401.
- 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(10):3007-3012.
- Kitch T, Appelbaum P. Ability of RapID Yeast Plus System to identify 185 clinically isolated yeasts within 5 hours. *Abst Ann Meeting Amer Soc Microbiol Abstract C419* 1995.
- Kitch T, Jacobs M, McGinnis M, Appelbaum P. Ability of RapID Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. *J Clin Microbiol*, May 1996;34(5):1069-1071.
- Kiviat N, Koutsky L, Critchlow C, Galloway D, Vernon D, Peterson M, McElhose P, Pendas S, Stevens C, Holmes K. Comparison of Southern transfer hybridization and dot filter hybridization for detection of cervical human papillomavirus infection with types 6, 11, 16, 18, 31, 33, and 35. *Am J Clin Pathol* 1990;94:561-565.
- Klebanoff S, Hillier S, Eschenbach D, Waltersdorff A. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂ generating lactobacilli. *J Infect Dis* 1991;164:94-100.
- Klein J, Watanakunakorn C. Hospital-acquired fungemia. Its natural course and clinical significance. *Am J Med* 1979;67:51-58.
- Klein R, Harris C, Small C, Moll B, Lesser M, Friedland G. Oral candidiasis in high risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl J Med* 1984;311:354-357.

- Kline M. Oral manifestations of pediatric human immunodeficiency virus infection: a review of the literature. *Pediatrics* 1996;97:380-388.
- Klufio C, Amoa A, Delamare O, Hombhanje M, Kariwiga G, Igo J. Prevalence of vaginal infections with bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among pregnant women at the Port Moresby General Hospital Antenatal Clinic. *P N G Med J* 1995;38(3):163-171.
- Knight L, Fletcher J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibodies, corticosteroids and diabetes mellitus. *J Infect Dis* 1971;123:174-177.
- Koehler A, Chu K, Houang E, Cheng A. Simple, reliable and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1999;37(2):422-426.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Win W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Editorial Médica Panamericana. 1999.
- Korstanje M, Staats C. Fungal infections in the Netherlands. Prevailing fungi and pattern of infection. *Dermatology* 1995;190:39-42.
- Korth H, Pulverer G. Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. *App Mrobiol* 1971;21(3):541-542.
- Kossoff E, Buescher E, Karlowicz M. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17(6):504-508.
- Kozinn P.J, Taschdjian C.L, Dragutsky D, Minsky A. Cutaneous candidiasis in early infancy and childhood. *Pediatrics* 1957;20:827-834.
- Kralovicova K, Spanik S, Oravcova E, Mrazova M, Morova E, Gulikova V, Kukuckova E, Koren P, Pichna P, Nogova J, Kunova A, Trupl J, Krcmery Jr V.

Fungemia in cancer patients undergoing chemotherapy versus surgery: risk factors, etiology and outcome. *Scand J Infect Dis* 1997;29(3):301-304.

Krcmery S, Dubrava M, Krcmery V Jr. Fungal urinary tract infections in patients at risk. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11(3-4):289-291.

Krcmery V Jr, Mrazova M, Krunova A, Grey E, Mardiak J, Jurga L, Sabo A, Sufliarsky J, Sevcikova L, Sorkovska D, West D, Trupl J, Novotny J, Mateicka F. Nosocomial candidaemias due to species other than *Candida albicans* in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. *Support Care Cancer* 1999;7(6):428-431.

Krcmery V Jr, Krupova I, Denning D. Invasive yeast infections other than *Candida* spp. in acute leukaemia. *J Hosp Infect* 1999;41(3):181-194.

Krcmery V Jr, Matejicka F, Pichnova E, Jurga L, Sulcova M, Kunova A, West D. Documented fungal infections after prophylaxis or therapy with wide spectrum antibiotics: relationship between certain fungal pathogens and particular antimicrobials?. *J Chemother* 1999;11(5):385-390.

Krcmery V Jr, Spanik S, Grausova S, Trupl J, Krupova I, Roidova A, Salek T, Sufliarsky J, Mardiak J. *Candida parapsilosis* fungemia in cancer patients—incidence, risk factors and outcome. *Neoplasma* 1998;45(5):336-342.

Krcmery V Jr, Spanik S, Kunova A, Trupl J, Grausova S, Krupova I, Mateicka F, Pichnova E, Grey E, Sabo A. Nosocomial *Candida krusei* in cancer patients: report of 10 cases and review. *J Chemother* 1999;11(2):131-136.

Kreger van Rij N. The yeast. A taxonomy study. 3^a ed. Amsterdam: Elsevier Sci Publ BV 1984.

Krusei-color® Fumouze. Laboratoires Fumouze, Asnières, France 1995.

Kudelko N. Allergy in chronic monilial vaginitis. *Ann Allergy* 1971;29:266-267.

- Kullaa-Mikkonen A, Kotilainen R. The prevalence of oral carriers of *Candida* in patients with tongue abnormalities. *J Dent* 1983;11:313-317.
- Kumar S, Joshi K, Mathur J, Mathur D. A study of the germ tube formation by *Candida albicans* in biological fluids of diabetic patients. *Indian J Pathol Microbiol* 1980;23:45-49.
- Kumar S, Mathur D, Chaudhary S, Chawla S. A comparative study of the germ tube formation by *Candida albicans* in serum and saliva of healthy individuals and diabetic patients. *J Postgrad Med* 1982;28:84-87.
- Kwoh D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, DiMichele L, Gingeras T. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1173-1177.
- Kwok Y, Tay Y, Goh C, Kamarudin A, Koh M, Seow C. Epidemiology and in vitro activity of antimycotics against candidal vaginal/skin/nail infections in Singapore. *Int J Dermatol* 1998 Feb;37(2):145-149.
- Kwon-Chung K, Bennett J. Laboratory diagnosis. In *Medical Mycology*. Malvern, PA: Lea and Febiger. 1992. pp 61-62.
- Lagenbeck B. Auffingung von Pelzen aus der Schleimhaut der speiserohre einer Typhus Leiche. *Neue Nat Gebr Natur-u-Heik (Froriep)* 1839;12:145-147.
- Lal S, Mitsuyama M, Miyata M, Ogata N, Amako K, Nomoto K. Pulmonary defence mechanism in mice. A comparative role of alveolar macrophages and polymorphonuclear cells against infection with *Candida albicans*. *J Clin Lab Immunol* 1986;19:127-133.
- Land G, Burke J, Shelby C, Rhodes J, Colett J, Bennett I, Johnson J. Screening protocol for *Torulopsis (Candida) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2300-2303.

- Land G, Harrison B, Hulme K, Cooper B, Byrd J. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *J Clin Microbiol* 1979;10:357-364.
- Land G, Salkin I, El-Zaatari M, McGinnis M, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1991;29:718-722.
- Land G, Salkin I. Uncommon yeastlike zoopathogens and commercial systems for their identification. *Mycopathologia* 1987;99:155-171.
- Land G, Stotler R, Land K, Staneck J. Update and evaluation of the AutoMicrobic yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1984;20:649-652.
- Landau J, Dabrowa N, Newcomer V. The rapid formation of serum filaments by *Candida albicans*. *J Invest dermatol* 1965;44:171-179.
- Lapan B. Is the "pill" a cause of vaginal candidiasis?. Culture study. *N Y J Med* 1970;70:949-951.
- Larone D. Medically important fungi. A guide to identification. 3^a Edition. ASM Press Washington, D C 1995.
- Larrocha C, Fernández de Castro M, Fontan G, Vilorio A, Fernández-Chacón J, Jiménez C. Hereditary myeloperoxidase deficiency: study of 12 cases. *Sacnd J Haematol* 1982;29:389-397.
- Launay O, Lortholary O, Bouges-Michel C, Jarrousse B, Bentata M, Guillevin L. Candidemia: a nosocomial complication in adults with late-stage AIDS. *Cinical Infectious Diseases* 1998;26:1134-1141.
- Laurent F, Cahen P, Honderlick P. Utilisation du réactif Bichrolatex Albicans pour l'identification rapide de *Candida albicans* dans les falcons d'hémoculture. *J Mycol Med* 1996;6:19-21.

- Lavarde V, Cohen M, Kervroedan P. Evaluation d'une nouvelle galerie auxanogramme des levures á lecture colorimétrique. Etude comparative avec la galerie API 20C AUX (Comuncation affichée). Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale/Paris 1990.
- Lavarde V, Daniel F, *et al.* Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*. Bull Soc Fr Mycol Med 1984;13:173-176.
- Lee B, Cheung P, Robinson J, Evanochko C, Robertson C. Comparative study of mortality and morbidity in premature infants (birth weight, <1,250g) with candidemia or candidal meningitis. Clin Infect Dis 1998;27(3):559-565.
- Leegaard M. The incidence of *Candida albicans* in the vagina of "Healthy young women". How often do they have symptoms?. Acta Obstet Gynecol Scand 1984;63:85-90.
- Lees A, Rau S, *et al.* Endocarditis due to *Torulopsis glabrata*. Lancet 1971;1:943-944.
- Lehner T, Ward R. Iatrogenic oral candidosis. Br J Dermatol 1970;83:161-166.
- Lehrer R, Cline M. Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. J Bacteriol 1969;98:996-1004.
- Lehrer R. Antifungal effects of peroxidase systems. J Bacteriol 1969;99:361-365.
- Lelarge P, Mariot J. Systemic candidiasis. Ann Fr Anesth Reanim 1992;11(5):558-575.
- León Regidor M, Torres de Dalmases C, Días Boladeras R, Soria-Guerrero G, Nolla-Salas M. Candidosis en UCI. Nueva estrategia diagnóstica para un tratamiento precoz en pacientes en estado crítico. Rev Iberoamer Micol 1993;S1:28-31.

- Lewis J, Fakile O, Foss E, Legarza G, Leskys A, Lowe K, Powning D. Direct DNA probe assay for *Neisseria gonorrhoeae* in pharyngeal and rectal specimens. J Clin Microbiol 1993;31:2783-2785.
- Leyden J, Kligman, A. The role of microorganisms in diaper dermatitis. Arch Dermatol 1978;114:56-59.
- Liao W, Zhao Z, Zhao H. Research on rapid identification of auto-microbiology system for pathogenic yeast. Chin Med J (Engl) 1992;105(4):319-321.
- Lin C, Fung D. Conventional and rapid methods for yeast identification. Crit Rev Microbiol 1987;14(4):273-289.
- Lipperheide V, Andraka J, Pontón J, Quindós G. Evaluation of the Albicans ID® plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. Mycoses 1993;36(11-12):417-420.
- Llinares-Mondejar P, Nuñez Fernández M, Cordero Lorenzana L, Pereira Santelesforo S, Romero Picos E, Moure Crespo R. Nosocomial infective endocarditis in patients without hear prosthesis. Rev Clin Esp 1997;197(12):814-818.
- Lockhart S, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll D. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. J Dent Res 1999;78(4):857-868.
- Lodder J, Kreger van Rij. The yeasts. A taxonomic study. Amsterdam: North-Holland Publishing Co. 1952.
- Lodder J. The yeasts. A taxonomic study. 2^a ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Co. 1970.

- Loesche W, Taylor G, Domínguez L, Grossman N, Stoll J. Factors which are associated with dental decay in the older individual. *Gerodontology* 1999;16(1):37-46.
- López-Dupla M, Mora Sanz P, Pintado García V *et al.* Clinical, endoscopic, immunologic and therapeutic aspects of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV-infected patients: a survey of 114 cases. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1771-1776.
- Louria D. Superinfection due to fungi. Proceedings of the International Conference on Nosocomial Infections. Center for Disease Control, Atlanta 1971.
- Louwagie B, Surmont I, Verhaegen J, Odds F. Differential and enrichment media for selective culture and recognition of yeast species from clinical material. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:406-411.
- Lumbreras C, Fernández I, Velosa J, Munn S, Sterioff S, Paya C. Infectious complications following pancreatic transplantation: incidence, microbiological and clinical characteristics, and outcome. *Clin Infect Dis* 1995;20(3):514-520.
- Lynch P, Minkin W, Smith E. Ecology of *Candida albicans* in candidiasis of the groin. *Arch Dermatol* 1969;99:154-160.
- Mackenzi D. Serum tube identification of *C. albicans*. *J Clin Pathol* 1962;15:563-565.
- Macmillan B, Law E, Holder I. Experience with *Candida* infections in the burn patient. *Arch Surg* 1972;104:509-514.
- Macura A, Laskownicka Z, Macura C. Fungi causing superficial cutaneous mycoses in the district of Cracow. *Mykosen* 1984;27:102-106.
- Maddocks J, Greenan M. Technical method. A rapid method for identifying bacterial enzymes. *J Clin Pathol* 1975;28:686-687.

Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology 1995. American Society for Microbiology, Washington, D C, 1995.

Marmioli N, Tedeschi F, Sabatini M, Truzzi G, Ferrari C, Puglisi P. Relationship between growth inhibition and mitochondrial function in petite-negative yeast. II. Effects of central nervous system drugs upon pathogenic and non-pathogenic *Candida* species. *Biol Cell* 1985;53:75-79.

Marples M. Microbiological studies in western Samoa. II. The isolation of yeast-like organisms from the mouth with a note of some dermatophytes isolated from lesions of tinea corporis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1960;54:166-170.

Marsh P, Tally F, Kellum J, Callow A, Gorbach S. *Candida* infections in surgical patients. *Ann Surg* 1983;198:42-47.

Marshall J, Christou N, Meakins J. The gastrointestinal tract. The “undrained abscess” of multiple organ failure. *Ann Surg* 1993;218(2):111-119.

Martin M, White F. A microbiologic and ultrastructural investigation of germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *Am J Clin Pathol* 1981;75:671-676.

Martin M. Germ-tube-positive *Candida tropicalis*. *Am J Clin Pathol* 1979;71:130.

Martín M. Nosocomial infections in intensive care units: an overview of their epidemiology, outcome, and prevention. *New Horiz* 1993;1(2):162-171.

Martino P, Girmenia C, Micozzi A, Raccach R, Gentile G, Venditi M, Mandelli F. Fungemia in patients with leukemia. *Am J Med Sci* 1993;306(4):225-232.

Masia Canuto M, Gutiérrez Rodero F, Ortiz de la tabla Ducasse V, Martín González C, Escolano Hortelano C, Mora Rufete A, Martín Hidalgo A. Epidemiology of

yeast colonization and oropharyngeal infection other than *Candida albicans* in patients with HIV infection. *Med Clin (Barc)* 1999;112(6):211-214.

Mathaba L, Paxman A, Ward P, Forbes D, Warmington J. Genetically distinct strains of *Candida albicans* with elevated secretory proteinase production are associated with diarrhoea in hospitalized children. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(1):53-60.

Mathew R, Ranjit M, Rajamani M. Postoperative endocarditis due to *Candida tropicalis*. *J Assoc Physicians India* 1999;47(9):921-922.

Mathur S, Goust J, Horger E III, Fudenberg H. Immunoglobulin E anti-*Candida* antibodies and candidiasis. *Infect Immun* 1977;18:257-259.

Matthews J, Kricka L. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal Biochem* 1988;169:1-25.

Mayser P. Mycotic infections of the penis. *Andrologia* 1999;31(suppl 1):13-16.

McGinnis M, Ajello I, Beneke E, Drouhet E, Goodman N, Halde C, Harley L, Kane J, Land G, Padhye A, Pincus D, Rinaldi M, Rogers A, Salkin I, Schell W, Weitzman I. Taxonomic and nomenclatural evaluation of the genera *Candida* and *Torulopsis*. *J Clin Microbiol* 1984;20:813-814.

McGinnis M, Molina T, Pierson D, Mishra S. Evaluation of the Biolog MicroStation system for yeast identification. *J Med Vet Mycol* 1996;34(5):349-352.

McGinnis M. Recent taxonomic developments and changes in medical mycology. *Ann Rev Microbiol* 1980;34:109-135.

McGinnis M. Yeast identification. In *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York: Academic Press. 1980. pp 364-367.

- McGowan K, Mortensen J. Identification of clinical yeast isolates by using the Microring YT. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):185-187.
- Meiller T, Jabra-Risk M, Baqui A, Kelley J, Meeks V, Merz W, Falkler W. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88(5):573-580.
- Meis J, Ruhnke M, De Pauw B, Odds F, Siegert W, Verweij P. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* 1999;5:150-153.
- Melamed R, Leibovitz E, Abramson O, Levitas A, Zucker N, Gorodisher R. Successful non-surgical treatment of *Candida tropicalis* endocarditis with liposomal amphotericin-B (AmBisome). *Scand J Infect Dis* 2000;32(1):86-89.
- Mencl K, Otcenasek M, Spacek J, Rehulova E. *Aspergillus restrictus* and *Candida parapsilosis* agents of endocarditis following heart valve replacement. *Mykosen* 1985;28:127-133.
- Menezes A, Sigismund D, Demajo W, Devenyi R. Mortality of hospitalized patients with *Candida* endophthalmitis. *Arch Intern Med* 1994;154(18):2093-2097.
- Merlino J, Tambosis E, Vela D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmación of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1157-1159.
- Meunier F, Aoun M, Bitar N. Candidemia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S120-S125.
- Meunier F. Opportunistic fungal infections in cancer patients: an emerging problem. En: Torres-Rodríguez J. Proceedings Xth ISHAM Congress. Barcelona. JR Prous Science Publishers. 1988. pp 289-291.

- Miller N, Hernández s, Cleary T. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. J Clin Microbiol 1994;32:393-397.
- Mims C. The pathogenesis of infectious disease. Academic Press, London. 3rd ed. 1987.
- Minkowitz S, Koffler, *et al.* *Torulopsis glabrata* septicemia. Am J Med 1963;34:252-255.
- Minoli G, Terruzzi V, Ferrara A, Casiraghi A, Rocca F, Rainer H, Porro A, Butti G, Mandelli P, Piffer R, Lampertico P. A prospective study of relationships between benign gastric ulcer. *Candida* and medical treatment. Am J Gastroenterol 1984;79:95-97.
- Mirdha BR, Sethi S, Banerjee U. Prevalence of fungal species in patients with funguria. Indian J Med Res 1998 Feb;107:90-93.
- Miró J, Bisbe J. Infecciones fúngicas relacionadas con la adicción a drogas. Rev Iberoamer Micol 1993;S1:18-24.
- Miró J, Del Palacio A, Martínez M, De la Cuadra J, Odds F. Predominio de *Candida albicans* serotipo A, biotipo 153/7 en los brotes de candididasis diseminada en heroinómanos en España. Med Clin 1987;89:38.
- Mitchell K, Bradley J, Ledingham I, Hamilton D. *Candida* colonization of the oral cavity. Surg Gynecol Obstet 1982;154:870-874.
- Mitchell K. Oral *Candida* colonization in surgical patients. J Roy Coll Surg Edinb 1982;27:50-52.
- Moffett M, Macgill M. Treatment of trichomoniasis with metronidazole. Br Med J 1960;2:910-911.

- Moghaddas J, Truant A, Jordan C, Buckley H. Evaluation of the RapID Yeast Plus System for the identification of yeast. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35(4):271-273.
- Mohamed A. Ultrastructural aspects of chronic oral candidosis. *J Oral Pathol* 1975;4:180-194.
- Molina V, Pizzocaro P, Gregotti R, Carozzi F. Rapid identification of *C. albicans* on a primary isolation medium by a new fluorogenic method: MUAG Candi test. Abstr XXVIII AMCLI Congress. Roma. 1989.
- Molina V, Pizzocaro. Valutazione di un nuovo metodo rapido (MUAG CANDI TEST) per l'identificazione di *Candida albicans* su terreno di prima semina. Documenta n. 7 Ed. Mascia Brunelli-Biolife 1989.
- Montes L, Krumdieck C, Cornwell P. Hypovitaminosis A in patients with mucocutaneous candidiasis. *J Infect Dis* 1973;128:227-230.
- Moosman K, Bojanovsky A. Rezidivierende candidosis bei myeloperoxidase mangel. *Mnschr Kinderheilk* 1975;123:408-409.
- Moran G, Sanglard D, Donnelly S, Shanley D, Sullivan D, Coleman D. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1819-1830.
- Moran G, Sullivan D, Henman M, McCreary C, Harrington B, Shanley D, Coleman D. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:617-623.
- Moreno A, Mensa J, Almela M, Vilardeñ J, Navasa M, Claramonte J, Cruceta A, Serrano R, García-Valdecasas J, Soriano E, *et al.* 138 episodes of bacteremia or

fungemia in patients with solid organ (renal or hepatic) transplantation. Med Clin 1994;103(5):161-164.

Morris D, Sugrue D. Miconazole nitrate compared with chlordantoin in the treatment of vaginal candidiasis. Br J Vener Dis 1975;51:123-124.

Morrow-Brown H, Storey G, Jackson F. Beclomethasone dipropionate aerosol in long term treatment of perennial and seasonal asthma in children and adults: a report of five and a half years experience in 611 asthmatic patients. Br J Clin Pharmacol 1977;4:259S-267S.

Moskona D, Kaplan I. Oral lesions in elderly denture wearers. Clin Prev Dent 1992;14(5):11-14.

Moulin F, Quintart A, Sauvestre C, Mensah K, Bergeret M, Raymond J. Nosocomial urinary tract infections: retrospective study in a pediatric hospital. Arch Pediatr 1998;5(Suppl 3):274S-278S.

Mourad M, Mokhtar M, Maible S, Fathalla M, Shaaban M. Vaginal moniliasis and the "pill". J Egypt Med Assoc 1974;57:378-381.

Moursi H, Refai M. The effect of hormones on some fungi *in vitro*. Mykosen 1968;11: 747-754.

Mousa H. Fungal infection of burn wounds in patients with open and occlusive treatment methods. East Mediterr Health J 1999;5(2):333-336.

Moyses Neto M, Costa R, Reis M, García T, Ferraz A, Saber L, Batista M, Muglia V, Figueiredo J. Candidiasis in kidney transplant patients. Rev Soc Bras Med Trop 1997;30(6):485-491.

Müller H, Kirchhoff G. Serologische typen von *Candida albicans*. Zbl Bakteriol 1969;210:114-121.

- Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
- Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-65.
- Muñoz-Pérez M, Rodríguez-Pichardo A, Camacho Martínez F. Sexually transmitted diseases in 1161 HIV-positive patients: a 38-month prospective study in southern Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;11:221-226.
- Myerowitz R, Pazin G, Allen C. Disseminated candidiasis. Changes in incidence, underlying diseases and pathology. *Am J Clin Pathol* 1977;68:29-38.
- Naef M, von Overbeck J, Seiler C, Baer H. *Candida* infection in surgery. *Chirurg* 1994;65(9):785-790.
- Nagesha C, Ananthakrishna N. Clinical and laboratory study of monilial vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1970;107:1267-1268.
- Nanetti A, Stancari F, Ferri M, Mazzoni A. Relationship between *Candida albicans* and denture stomatitis: a clinical and microbiological study. *New Microbiol* 1993;16(3):287-291.
- Narang A, Agrawal P, Chakrabarti A, Kumar P. Epidemiology of systemic candidiasis in a tertiary care neonatal unit. *J Trop Pediatr* 1998;44(2):104-108.
- Narang A, Agrawal P, Chakrabarti A, Kumar P. Fluconazole in the management of neonatal systemic candidiasis. *Indian Pediatr* 1996;33(10):823-826.
- Nasser R, Melgar G, Longworth D, Gordon S. Incidence and risk of developing fungal prosthetic valve endocarditis after nosocomial candidemia. *Am J med* 1997;103(1):25-32.

- Navari R, Buckner C, Clift R, Storb R, Sanders J, Stewart P, Sullivan K, Williams B, Counts G, Meyers J, Thomas E. Prophylaxis of infection in patients with aplastic anemia receiving allogeneic marrow transplants. *Am J Med* 1984;76:564-572.
- Navarro F, Fuentes I, Izquierdo C, Sánchez F, Prats G. Evaluation of chromogenic medium CPS ID2 (bioMérieux) in urine cultures. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14(4):215-219.
- Navazesh M, Wood G, Brightman V. Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* counts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:284-288.
- Neeman A, Kadish U. Candidal infection of benign gastric ulcer. *Gastroenterology* 1984;87:1406-1407.
- Neumann G, Kaben U. Einfluss von östriol, östradiolbenzoat. Progesteron. Lochialsekret und Fruchtwasser auf des Wachstum von Hefepilzen *in vitro*. *Zbl Gynaekol* 1971;93:1147-1151.
- Newman D, Hogg J. *Torulopsis glabrata* pyelonephritis. *J Urol* 1969;102:547-548.
- Ng K, Madasamy M, Saw T, Baki A, He J, Soo-Hoo T. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. *Mycopathologia* 1998-99;144(3):135-140.
- Ngui Yen J, Smith J. Use of Autobac 1 for rapid assimilation testing of *Candida* and *Torulopsis* species. *J Clin Microbiol* 1978;7(2):118-121.
- Nicholls T, Morris A. Nosocomial infection in Auckland Healthcare hospitals. *N Z Med J* 1997;110(1050):314-316.
- Nieto-Rodríguez A, Kusne S, Manez R, Irish W, Linden P, Magnone M, Wing E, Fung J, Starzl T. Factors associated with the development of candidemia and

candidemia-related death among liver transplant recipients. *Ann Surg* 1996;223(1):70-76.

Niimi M, Cannon R, Monk B. *Candida albicans* pathogenicity: a proteomic perspective. *Electrophoresis* 1999;20(11):2299-2308.

Nolla J. Candidosis en el paciente quirúrgico grave. *Rev Iberoamer Micol* 1993;S1:25-27.

Nolla J. Fluconazol en el tratamiento de las candidosis en el paciente gravemente enfermo. *Rev Iberoamer Micol* 1993;S1:32-34.

Nucci M, Silveira M, Spector N, Silveira F, Velasco E, Martins C, Derossi A, Colombo A, Pulcheri W. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-*albicans* species. *Mycopathologia* 1998;141:65-68.

Oblack D, Rhodes J, Martin W. Clinical evaluation of the AutoMicrobic System Yeast Biochemical Card for rapid identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1981;13:351-355.

Odds F, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for the presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1923-1929.

Odds F, Evans E, Taylor M, Wales J. Prevalence of pathogenic yeasts and humoral antibodies to *Candida* in diabetic patients. *J Clin Pathol* 1987;31:840-844.

Odds F, Evans E. Distribution of pathogenic yeasts and humoral antibodies to *Candida* among hospitalized patients. *J Clin Pathol* 1980;33:750-756.

Odds F, Rinaldi M, Cooper Jr C, Fothergill A, Pasarell L, McGinnis M. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):313-316.

- Odds F, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin Microbiol 1998;36(10): 2869-2873.
- Odds F. Antifungal agents and their use in *Candida* infections. En Odds FC: *Candida* and Candidosis. A review and bibliography. London. Baillière Tindall. 1988. pp 279-313.
- Odds F. *Candida* and Candidosis. A review and bibliography. 2nd ed. London, Baillière Tindall. 1988.
- Odds F. Sabouraud ('s) agar. J Med Vet Mycol 1991;29:355-359.
- Odds R. *Candida* and Candidosis. Leicester, Leicester University Press 1979.
- Oldfield F, Kapica J, et al. Pulmonary infection due to *Torulopsis glabrata*. Can Med Assoc J 1968;98:165-168.
- Oliver D, Shillitoe E. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. J Oral Pathol 1984;13:265-270.
- Oller L. Prevention of post-metronidazole candidosis with amphotericine B pessaries. Br J Vener Dis 1969;45:163-166.
- Otero L, Palacio V, Carreño F, Méndez F, Vázquez F. Vulvovaginal candidiasis in female sex workers. Int J STD & AIDS 1998;9:526-530.
- Ozturkcan S, Ozturkcan S, Topcu S, Akinci S, Bakici M, Yalcin N. Incidence of oral candidiasis in diabetic patients. Mikrobiyol Bul 1993;27(4):352-356.
- Pacheco-Ríos A, Avila-Figueroa C, Nobigrot-Kleinmam D, Santos J. Mortality associated with systemic candidiasis in children. Arch Med Res 1997;28(2):229-232.

Padovani E, Michielutti F, Dall'Agola A, Dal Moro A, Khoory B. Sepsis caused by *Candida* in the neonatal period. *Pediatr Med Chir* 1997;19(2):83-88.

Pagano L, Antinori A, Ammassari A, mele L, Nosari A, Melillo L, Martino B, Sanguinetti M, Equitani F, Nobile F, Carotenuto M, Morra E, Morace G, Leone G. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. *Eur J Haematol* 1999;63(2):77-85.

Paige C, Pinson C, Antonovic R, Strausbaugh L. Catheter-related thrombophlebitis of the superior vena cava caused by *Candida glabrata*. *West J Med* 1987;147:333-335.

Palacios R, Santos J, Romero C, García V, Rivero A, Márquez M. Fungemia by *Candida non albicans* in patients with HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17(6):279-282.

Paradis I, Williams P. Infection after lung transplantation. *Semin Resp Infect* 1993;8(3):207-215.

Parker J.C. Jr., Maccloskey J.J, Knauer K.A. Pathobiology features of human candidiasis. A common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. *Am J Clin Pathol* 1976;65:991-1000.

Parker J.C. Jr., Maccloskey J.J, Solanki K.V, Goodman N.I. Candidosis: The most common postmortem cerebral mycosis in an endemic fungal area. *Surg Neurol* 1976;6:123-128.

Parrot J. Clinique des nouvea-nés. L'athrepsie. Lecons recueillies par le Dr. Troisier. París, G Massoon et cie 1877.

Patel H, Peters M II, Smith C. Is there a role for fluconazole in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Ann Pharmacother* 1992;26:350-353.

- Patel P, Thomas E. A Shaggy esophagus. *J Tenn Med Assoc* 1986;79:289-291.
- Patel R, Portela D, Badley A, Harmsen W, Larson-Keller J, Ilstrup D, Keating M, Wiesner R, Krom R, Paya C. Risk factors of invasive *Candida* and non-*Candida* fungal infections after liver transplantation. *Transplantation* 1996;62(7):926-934.
- Paugam A, Benchetrit M, Fiacre A, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions. *Med Mycol* 1999;37(1):11-17.
- Pavese P, Brion J, Lebeau B, Grillot R, Ambroise-Thomas P. Epidemiology of fungemia in a university hospital; therapeutic incidence. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(5):579-583.
- Paya C. Fungal infections in soli-organ transplantation. *Clin Infect Dis* 1993;16(5):677-688.
- Penk A, Pittrow L. Fungal arthritis—a rare complication of systemic candidiasis or orthopedic intervention. Review of therapeutic experience with fluconazole. *Mycoses* 1998;41(Suppl 2):45-48.
- Pepin J, Morgan G, Dunn D, Gevao S, Mendy M, Gaye I, Scollen N, Tedder R, Whittle H. HIV-2 induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS* 1991;5(10):1165-1172.
- Pereiro M, Iglesias A, Labandeira J, Pereiro Ferrerirós M, Toribio J. Candidosis en un Servicio de Dermatología durante 10 años. *Rev Iberoamer Micología* 1994;11:s50.
- Perfect J, Schell W. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22(suppl 2):S112-S118.

- Perfect J. Antifungal therapy and its use in surgical treatment. *Surgery* 1990;171:41-48.
- Perry J, Miller G, Carr D. Rapid, colorimetric identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):614-615.
- Perry J, Miller G. Umbelliferyl-labelled galactosaminide as aid in identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1987;25(12):2424-2425.
- Persing D. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-1285.
- Peters F, Snauwaert R, Segers J, Van Cutsem J, Amery W. Observations on Candidal vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1972;112: 80-86.
- Peterson L, Ketty R, *et al.* Therapy of *Candida* peritonitis: penetration of amphotericin B into peritoneal fluid. *Postgrad Med J* 1978;54:340-342.
- Pfaller M, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):58-61.
- Pfaller M, Jones R, Doern G, Fluit A, Verhoef J, Sader H, Messer S, Houston A, Coffman S, Hollis R. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35(1):19-25.
- Pfaller M, Jones R, Messer S, Edmond M, Wenzel R. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the

SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and control of pathogens of epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30(2):121-129.

Pfaller M, Lockhart S, Pujol C, Swails-Wenger A, Messer S, Edmond M, Jones R, Wenzel R, Soll D. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:1518-1529.

Pfaller M, Messer S, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan D, Coleman D, Soll D. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999;37:870-872.

Pfaller M, Preston T, Bale M, Koontz F, Body B. Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident and AutoMicrobic Systems for identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1988;26(10):2054-2058.

Pfaller M. Epidemiological typing methods for mycose. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S4-S10.

Pfaller M. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis* 1994;19(Suppl 1):S8-S13.

Pfaller M. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect* 1995;30:329-338.

Phillips J, Karlowicz M. Prevalence of *Candida* species in hospital-acquired urinary tract infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(2):190-194.

Picarelli D, Leone R, Duhagon P, Peluffo C, Zuniga C, Gelos S, Canessa R, Nozar J. Active infective endocarditis in infants and childhood: ten-year review of surgical therapy. *J Card Surg* 1997;12(6):406-411.

Pierard G. Unusual candidosis superimposed to pox and herpes-virus infections in a patients with AIDS. *Ann Pathol* 1986;6:225-227.

- 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(11):3533-3539.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998;36(7):2093-2095.
- Pittet D, Harbarth S, Ruef C, Francioli P, Sudre P, Petignat C, Trampuz A, Widmer A. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20(1):37-42.
- Plaut H. Neue Beträge zur systematischen Stellung des Soor pilzes in der Botanik. Leipzig, H Voigt 1887.
- Plouffe J, Brown D, Silva J Jr, Eck T, Stricof R, Fekety F. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous infusions. Arch Intern Med 1977;137:1686-1689.
- Plummer N. *Candida* infections of the lung. In: Winner H, Hurley R (eds.) Symposium on *Candida* infections. Livingstone, Edinburgh 1966. pp 214-220.
- Podolsky S, Ferguson B. Fatal systemic candidiasis following treatment of Addisonian crisis in a juvenile diabetic. Diabetes 1970;19:438-444.
- Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin I, Coleman D. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. J Clin Microbiol 2000;38(1):170174.
- Ponton J, Jones J. Identification of two germ tube specific cell wall antigens of *Candida albicans*. Infect Immun 1986;54:864-868.

- Porter P, Lyle J. Yeast vulvovaginitis due to oral contraceptives. Arch Dermatol Syph 1966;93:402-403.
- Potter L, Papasian C. Identification of *Candida albicans* with a commercially prepared germ-tube solution. Clin Lab Sci 1991;4(2):121-122.
- Powell H, Sand C, Rennie R. Evaluation of CHROMagar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;32(3):201-204.
- Pradeepkumar V, Rajadurai V, Tan K. Congenital candidiasis: varied presentations. J Perinatol 1998;18(4):311-316.
- Prager R, Silva J. Colonization of central venous catheters. South Med J 1984;77:458-461.
- Prose N. HIV infection in children. J Am Acad Dermatol 1990;22:1223-1231.
- Puapermpoonsiri S, Kato N, Watanabe K, Ueno K, Chongsomchai C, Lumbiganon P. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in Japanese and Thai pregnant women. Clin Infect Dis 1996;23(4):748-752.
- Qadir M, Cunha B. Penicillium peritonitis in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Heart Lung 1998;27(1):67-68.
- Qadri S, Flournoy D, Qadri S, Ramirez E. Rapid identification of yeasts by semi-automated and conventional methods. Med Microbiol Immuno (Berl) 1986;175(5):307-316.
- Qamar A. *Candida* onychomycosis-an evaluation of the *Candida* species as primary keratinolytic yeasts in nail disease. J P A M 1992;42:140-143.
- Quabeck K. The lung as critical organ in marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1994;14(Suppl 4):S19-S28.

- Quindós G, Carrillo-Muñoz A, Arévalo M, Salgado J, Alonso-Vargas R, Ruesga M, Valverde A, Pemán J, Cantón E, Martín-Mazuelos E, Pontón J. Susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemoter* 2000 (in press).
- Quindós G, Lipperheide V, Barturen B, Alonso R, Bikandi J, San Millán R, Tellaetxe M, Ribacoba L, Pontón J. A new method of antibiotyping yeasts for subspecies discrimination and distribution in human clinical specimens. *Eur J Epidemiol* 1996;12(1):55-62.
- Quindós G, Lipperheide V, Pontón J. Evaluation of two commercialized systems for the rapid identification of medically important yeasts *Mycoses* 1993;36:299-303.
- Quindós G, San Millán R, Bikandi J, Pontón J. Utilidad de las placas de agar Fluoroplate *Candida* para la identificación rápida de *Candida albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14(10):586-589.
- Quindós G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J. Evaluation of Bichro-latex Albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997;35(5):1263-1265.
- Quinn P, Horstmeier C. Evaluation of Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) with an expanded data base for the identification of clinically important yeasts and yeast-like organisms, abstr. F-11, p. 410. Abstr. 90th Annu Meet Am Soc Microbiol 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990.
- Quinquaud M. Nouvelles recherches sur le muguet. *Arch Physiol Norm Pathol* 1868;1:290-305.
- Raad II. The pathogenesis and prevention of central venous catheter-related infections. *Middle East J Anesthesiol* 1994;12(4):381-403.

- Radford D, Challacombe S, Walter J. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10(1):99-116.
- Radin D, Fong T, Halls J, Pontrelli G. Monilial enteritis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Roentgenol* 1983;141:1289-1290.
- Rajendran C, Basu T, Baby A, Kumari S, Verghese T. Incidence and significance of opportunistic fungi in leukemia patients in India. *Mycopathologia* 1992;119(2):83-87.
- Ramírez Moreno A, Anguita Sánchez M, Castillo Domínguez J, Siles Rubio J, Torres Calvo F, Valles Belsue F. Fungal endocarditis in non drug-addict patients. Ten years of experience. *Rev Esp Cardiol* 2000;53(4):507-510.
- Ramjee G, Karim S, Sturm A. Sexually transmitted infections among sex workers in KwaZulu-Natal, South Africa. *Sex transm Dis* 1998;25(7):346-349.
- Rangel-Frausto M, Wiblin T, Blumberg H, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards J Jr, Jarvis W, Dawson J, Wenzel R. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 1999;29(2):253-258.
- Rantala A. Postoperative candidiasis. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 1993;205:1-52.
- Rault R. *Candida* peritonitis complicating chronic peritoneal dialysis: a report of five cases and a review of the literature. *Am J Kidney Dis* 2:544-547.
- Raymond J, Aujard Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21(4):260-263

- Redding S, Zellars R, Kirkpatrick W, McAtee R, Caceres M, Fothergill A, López-Ribot J, Bailey C, Rinaldi M, Patterson T. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and identification in patients receiving radiation for head and neck cancer. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):3896-3900.
- Reess M. Ueber den Soorpilz. *S B Phys Med Soz Erlangen* 1877;9:190-193.
- Reik R, Rodríguez M, Hensley G. Infections in children with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome: an autopsy study of 30 cases in South Florida, 1990-1993. *Pediatric Pathol Lab Medicine* 1995;15:269-281.
- Reis M, Costa R, Ferraz A. Causes of death in renal transplant recipients: a study of 102 autopsies from 1968 to 1991. *J R Soc Med* 1995;88(1):24-27.
- Reiss E. *Candida albicans*. In: *Molecular Immunology of Mycotic and Actinomycotic Infections*. Elsevier. New York and Amsterdam 1986. pp 191-250.
- Rello J, Esandi M, Díaz E, Mariscal D, Gallego M, Vallés J. The role of *Candida* sp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998;114:146-149.
- Remel. BactiCard™ *Candida*. Cat. No. 21-106. 1993.
- Rennert G, Rennert H, Pitlik S, Finkelstein R, Kitzes-Cohen R. Epidemiology of candidemia—a nationwide survey in Israel. *Infection* 2000;28(1):26-29.
- Rennie R, Hellman L. Comparative activity *in vitro* of cilofungin (LY 121019) with other agents used for treatment of deep-seated *Candida* infections. *Mykoses* 1989;32:145-150.
- Reynolds R, Braude AI. The filament inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. *Clin Res Proc* 1956;4:40.

- Rhoads J, Wright D, Redfield R, Burke D. Chronic vaginal candidiasis in women with human immunodeficiency virus infection. *J Am Med Assoc* 1987;257:3105-3106.
- Ribeiro P, Sousa A, Nunes O, Aveiro F, Fernandes J, Gouveia J. Candidemia in acute leukemia patients. *Support Care Cancer* 1997;5(3):249-251.
- Richards M, Edwards J, Culver D, Gaynes R. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999;27(5):887-892.
- Richardson M, Kokki M. New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Amm Med* 1999;31(5):327-335.
- Richet H, Andreumont A, Tancrede C, Pico J, Jarvis W. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. *Rev Infect Dis* 1991;13(2):211-215.
- Riddle D, Giger O, Miller L, Hall G, Woods G. Clinical comparison of the Baxter MicroScan Yeast Identification Panel and the Vitek Yeast Biochemical Card. *Am J Clin Pathol* 1994;101(4):438-442.
- Ridgway E, Allen K. Evaluation of the Microring YT system for identifying clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1991;44(9):775-777.
- Rifkind D, Marchioro T, Schneck S, Hill R. Systemic fungal infections complicating renal transplantation and immunosuppressive therapy. *Am J Med* 1967;43:28-38.
- Ringel S. New antifungal agents for the systemic mycoses. *Mycopathol* 1990;109:78-87.

- Rippon JW. Infecciones oportunistas. Levaduras: Candidiasis y levaduras patógenas. Tratado de Micología Médica. 3ª edición. Interoamericana McGraw-Hill. 1988. pp 574-628.
- Robert R, Sentrandren R, Bernard C, Senet J. Evaluation du réactif Bichrolatex albicans® pour l'identification rapide de colonies de *Candida albicans*. J Mycol Med 1994;4:226-229.
- Roberts G, Horstmeier C, Land G, Foxworth J. Rapid urea broth test for yeasts. J Clin Microbiol 1978;7:584-588.
- Robertson D, Riley F, Hermans P. Endogenous *Candida* oculomycosis. Report of two patients treated with flucytosine. Arch Ophthalmol 1974;91:33-38.
- Robin C. Histoire Naturelle des Vegetaux. Parasites qui croissent-sur l'homme et sur les animaux vivants. Paris, Bailliere 1853.
- Robinett R. Asthma due to *Candida albicans*. Univ Mich Med Cent J 1968;34:12-15.
- Rodero L, Davel G, Cordoba S, Soria M, Canteros C, Hochenfellner F. Multicenter study on nosocomial candidiasis in the Republic of Argentina. Rev Argent Microbiol 1999;31(3):114-119.
- Rodero L, Losso M, Canteros C, Hochenfellner F, Davel G. *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. Rev Arg Microbiol 1998;30:39-41.
- Rodríguez R, Shinya H, et al. *Torulopsis glabrata* fungemia during prolonged intravenous alimentation therapy. N Engl J Med 1971;284:540-541.
- Rodríguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M. A multicenter study on fungemia caused by yeasts in Spain (April-June, 1997). A work group to study fungemia. Rev Clin Esp 1999;199(6):356-361.

- Rodu B, Griffin I, Gockerman J. Oral candidiasis in cancer patients. *South Med J* 1984;77:312-314.
- Rogosa M, Sharpe M. Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J Gen Microbiol* 1960;23:197-201.
- Rohm H, Lechner F, Lehner M. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol* 1990;11:251-224.
- Romanowski B, Weber J. Oral candidiasis and the acquired immunodeficiency syndrome. *Amm Intern Med* 1984;101:400-401.
- Romney M, Bryce E, Rennie R, Sand C. rapid identification of clinical yeast isolates using the colorimetric AUXACOLOR system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36(2):137-138.
- Rosa R Jr, Miller D, Alfonso E. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. *Ophthalmology* 1994;101(6):1005-1013.
- Rosen von Rosenstein N. *Underrattelse om Barms Sjukdomar och Deras Botemedal*. Estocolmo: Wenneberg & Nordstrom. 1771.
- Rossie K, Guggenheimer J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1997;9(6):635-642.
- Rousselle P, Freydière A, Couillerot P, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):3034-3036.
- Roux G, Linoscier G. Reserches morphologiques sur le champignon du muguet. *Arch Med Exp Anat Pathol* 1890;2:62-87.

- Rowen J, Rench M, Kozinetz C, Adams J Jr, Baker C. Endotracheal colonization with *Candida* enhances risk of systemic candidiasis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 1994;124(5Pt 1):789-794.
- Rowen J, Tate J, Nordoff N, Passarell L, McGinnis M. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3735-3737.
- Roy A, Mccallum R. Candidiasis of the duodenum: the role of continuous cimetidine therapy. *Gastrointest Endosc* 1984;30:47-48.
- Rubenstein J, Kabat K, Shulman S, Yogev R. Bacterial and fungal colonization of endotracheal tubes in children: a prospective study. *Crit Care Med* 1992;20(11):1544-1549.
- Rubinstein E, Lang R. Fungal endocarditis. *Eur Heart J* 1995;16(Suppl B):84-89.
- Russi E, Oelz O, Vogt P, Baumann P. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in a previously healthy homosexual man *Infection* 1983;11:196-197.
- Russolo S, Sala A, Crotti D. Identification of yeast-like fungi: evaluation of 4 commercial systems. *Quad Sclavo Diagn* 1984;20(4):372-378.
- Rutledge R, Mandel S, Wild R. *Candida* species: insignificant contaminant or pathogenic species. *Am Surg* 1986;52:299-302.
- Ryley J. Pathogenicity of *Candida albicans* with particular reference to vagina. *J Med Vet Mycol* 1986;24:5-22.
- Sabaté M. Estudi de la sensibilitat *in vitro* de 200 soques de *Candida* spp i *Torulopsis glabrata* a diferents antifúngics. Tesina de licenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona. 1988.

- Saccardo P. Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum. Hyphomyceteae, Pavia, Italy. 1886;4:1497.
- Sadeghi E, Witkop C. The presence of *Candida albicans* in hereditary benign intraepithelial dyskeratosis. Oral Surg 1979;48:342-346.
- Saiki P, gelfand D, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;239:487-491.
- Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin R, Dawson J, Blumberg H, Patterson J, Rinaldi M, Edwards J, Wenzel R, Jarvis W. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The national epidemiology of mycosis survey study group. Pediatr Infect Dis J 2000;19(4):319-324.
- Salkin I, Land G, Hurd N, Goldson P, McGinnis M. Evaluation of Yeast Ident and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. J Clin Microbiol 1987;25:624-627.
- Salkin I, Schadow K, Bankaitis L, McGinnis M, Kemna M. Evaluation of Abbott Quantum II yeast identification system. J Clin Microbiol 1985;22:442-444.
- Salzman M, Rubin L. Intravenous catheter-related infections. Adv Pediatr Infect Dis 1995;10:337-368.
- Samaranayake L, Wilkieson C, Lamey P, MacFarlane T. Oral disease in the elderly in long-term hospital care. Oral Dis 1995;1(3):147-151.
- Samaranayake L. Nutritional factors and oral candidiasis. J Oral Pathol 1986;15:61-65.
- Samaranayake L. Oral mycoses in HIV infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;73(2):171-180.

- Samaranayake Y, Samaranayake L. *Candida krusei*: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 1994;41(5):295-310.
- Samaranayake Y, Wu P, Samaranayake L, So M, Yuen K. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol* 1994;41(4):250-258.
- Samonis G, Bafaloukos D. Fungal infections in cancer patients: an escalating problem. *In vivo* 1992;6(2):183-193.
- Samonis G, Rolston K, Karl C, *et al.* Prophylaxis of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. *Rev Infect Dis* 1990;3:S369-S373.
- San Millán R, Bikandi J, Tellaetxe M, Liperheide V, Contreiras I, Pontón J, Quindós G. Distribución de aislamientos de levaduras de muestras clínicas recibidas en el laboratorio de Micología médica, Universidad del País Vasco, desde 1989 hasta 1993. *Rev Iberoamer Micol* 1993;10:89-90.
- San Millán R, Ribacoba L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15(2):153-158.
- Sandhu D, Sandhu R, *et al.* Isolation of *Candida viswanathii* from cerebral spinal fluid. *Sabouraudia* 1976;14:251-254.
- Sandhu R, Mehta S, Khan Z, Singh M. Role of *Aspergillus* and *Candida* species in allergic bronchopulmonary mycoses. *Scand J Resp Dis* 1979;60:235-242.
- Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990;48(1):27-36.
- Sangeorzan J, Bradley S, He X, Zarins L, Ridenour G, Tiballi R, Kauffman C. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization,

infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. Am J Med 1994;97(4):339-346.

Sanofi Pasteur. Manual de Candiselect, Auxacolor y Fungitest.

Saubolle M. Clinical significance and laboratory identification of yeasts. Lab Med 1984;15:98-103.

Scalise G, Ancarani F, Petrelli E. Le infezioni nel trapianto di fegato. Giornale di malattie infettive e parassitarie 1989;41:356-360.

Schechtman R, Archard H, Cox D. Oropharyngeal candidiasis associated with steroid-containing inhalers. N Z State Dent J 1986;52:24-26.

Scher R. Nail signs in systemic disease. In: Dialogues in dermatology. (Audiotape) 1991;28(2).

Scherer S, Stevens D. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:1452-1456.

Schmorl G. Ein Fall von Soormetastase in der Nier. Zentralbl Bakteriol 1890;7:329-335.

Schoofs A, Odds F, 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-Cli-Microbiol-Infect-Dis 1997;16(4):296-300.

Schorling S, Kortinga H, Froschb M, Muhlschlegel F. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. Crit Rev Microbiol 2000;26(1):59-68.

- Schuffenecker I, Freydière A, de Montclos H, Gille Y. Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:255-260.
- Schulz K, Bernhardt H, Schroder G. *Candida* identification: experiences with the Vitek automated system. *Mycoses* 1997;40(suppl 1):86-90.
- Schwarze R, Penk A, Pittrow L. Treatment of candidal infections with fluconazole in neonates and infants. *Eur J Med Res* 2000;5(5):203-208.
- Sclafer J, Hewitt S. Valeur des tests cutane's dans l'allergie a *Candida albicans*. *Pathol Biol* 1960;8:323-327.
- Sclafer J. *Micologie Medicale*. Expansion Scientifique Paris, Francia 1956. pp 191.
- Seelig M. Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses. *Bacteriol Rev* 1966.
- Seelig M. The rationale for preventing antibacterial-induced fungal overgrowth. *Med Times* 1968;96:689-710.
- Segal R, Kritzman A, Cividalli L, Samra Z, David M. Treatment of *Candida* nail infection with terbinafine. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:958-961.
- Seto B, Tsutsui P. Invasive *Candida albicans* infections of the oral cavity in immunocompromised patients. *J Oral Med* 1986;41:9-13.
- Shankland G, Hopwood V, Forster R, Evans E, Richardson M, Warnock D. Evaluation of the Microring YT, a new method of yeast identification. *J Clin Microbiol* 1990;28:2808-2810.
- Sharief M. Genital infections among women using various contraceptive methods in Basra, Iraq. *East Mediterr Health J* 1998;4(3):487-492.

- Shechtman L, Funaro L, Robin T, *et al.* Clotrimazole treatment of oral candidiasis in patients with neoplastic disease. *Am J Med* 1984;76:91-94.
- Shepherd M, Poulter R, Sullivan P. *Candida albicans*: Biology, genetics and pathogenicity. *Ann Rev Microbiol* 1985;39:579-614.
- Sheppard D, deSouza E, Hashmi H, Robson H, Rene P. Evaluation of the Auxacolor system for biochemical identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 1998;36:3726-3727.
- Sheppard D, Rene P, Harris A, Miller M, Laverdiere M, deSouza E, Robson H. Simple strategy for direct identification of medically important yeast species from positive blood culture vials. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):2040-2041.
- Sherertz R, Gledhill K, Hampton K, Pfaller M, Givneer L, Abramson J, Dillard R. Outbreak of *Candida* bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 1992;20(3):455-461.
- Shin J, Nolte F, Morrison C. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1454-1459.
- Shinoda T, Kaufman L, Padhye A. Comparative evaluation of Iatron Serological *Candida* Check Kit and the API 20 C Kit for identification of medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1981;13:513-518.
- Shopova E, Ioneva M. The identification of species of the genus *Candida*. *Akush Ginekol (Sofia)* 1996;35(1-2):36-37.
- Shumacher H, Ginns D, Warren W. Fungus infection complicating leukemia. *Am J Med Sci* 1964;247:313-323.

Shusterman N, Jacobs J. Management of refractory peritonitis to maintain the peritoneum for subsequent dialysis. *Perit Dial Int* 1992;12(2):211-213.

Siegel J. Clinical allergies and vulvovaginitis. *J Reprod Med* 1986;31(suppl):647.

Silverman S, Miguorati C, Lozada-Nur F, *et al.* Oral findings in people with or at high risk for AIDS: A study of 375 homosexual males. *JADA* 1986;112:187-192.

Simmonds J, Motyl M, McKittrick J. Evaluation of Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) with expanded data base and two rapid enzymatic panel: Microscan Yeast Identification Panel (YIP) and API Yeast-Ident (Y-I) systems for identification of medically important yeasts, abstr. 1068, p. 264. Program Abstr. 30th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990.

Simoës J, Giraldo P, Faundes A. Prevalence of cervicovaginal infections during gestation and accuracy of clinical diagnosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998;6(3):129-133.

Simon M, Houser W, Smith K, Long M. Esophageal candidiasis as a complication of inhaled corticosteroids. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79:333-338.

Simpanya M. Identification of *Candida albicans* and *C. tropicalis* with an umbelliferyl-labelled galactosaminide. *J Med Microbiol* 1995;43(3):230-233.

Singer C, Kaplan M, Armstrong D. Bacteremia and fungemia complicating neoplastic disease. *Am J Med* 1977;62:731-742.

Singh K, Chakrabarti A, Narang A, Gopalan S. Yeast colonisation & fungaemia in preterm neonates in a tertiary care centre. *Indian J Med Res* 1999;110:169-173.

- Sinnott J, Rubin R. Infections in transplantation. In: reese RE, Betts RF (eds) A practical approach to infectious diseases, 3rd edn. An MSD handbook. Boston, Little, Brown &Co. 1991. pp 619-642.
- Sitges-Serra A, Girvent M. Catheter-related bloodstream infections. *World J Surg* 1999;23(6):589-595.
- Skoglund R. Diabetes presenting with phimosis. *Lancet* 1971;2:1431.
- Smego R, Devoe P, Sampson H, Perfect J, Wilfert C, Buckley R. *Candida* meningitis in two children with severe combined immunodeficiency. *J Pediatr* 1984;104:902-904.
- Smith H, Congdon P. Neonatal systemic candidiasis. *Arch Dis Child* 1985;60:365-369.
- Smith M, Dunklee D, Vu H, Woods G. Comparative performance of the RapID yeast plus system and the API 20C AUX clinical yeast system. *J Clin Microbiol* 1999;37(8):2697-2698.
- Smith R, Blasi D, Dayton S. Phosphatase activity among *Candida* species and other yeasts isolated from clinical material. *Appl Microbiol* 1973;26:364-367.
- Smits B, Prior A, Arblaster P. Incidence of *Candida* in hospital in patients and the effects of antibiotic therapy. *Br Med J* 1966;1:208-210.
- Smolianskaia A, Dmitrieva N, Kulaga E, Petukhova I. Fungal infection in the oncologic clinic. *Antibiot Khimioter* 1999;44(4):25-30.
- Sobel J, Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2497-2499.
- Sobel J, Vázquez J. Fungal infections of the urinary tract. *World J Urol* 1999;17(6):410-414.

- Sobel J. Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol 1993;36:153-165.
- Sobel J. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 1985;152:924-935.
- Solomkin J, Flohr A, Simmons R. Indications for therapy for fungemia in postoperative patients. Arch Surg 1982;117:1272-1275.
- Solomon S, Khabbaz R, Parker R, *et al.* An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. J Infec Dis 1984;149:98-102.
- Sonck C, Somersalo O The yeast flora of the anogenital region in diabetic girls. Arch Dermatol 1963;88:846-852.
- Spellacy W, Zaias N, Buhi W, Birk S. Vaginal yeast growth and contraceptive practices. Obstet Gynecol 1971;38:343-349.
- Spinillo A, Capuzzo E, Acciano S, De Santolo A, Zara F. Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 1999;180(1 Pt 1):14-17.
- Spinillo A, Pizzoli G, Colonna L, Nicola S, De Seta F, Guaschino S. Epidemiologic characteristics of women with idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstet Gynecol 1993;81(5 (Pt 1)):721-727.
- Staib P, Michel S, Kohler G, Morschhauser J. A molecular genetic system for the pathogenic yeast *Candida dubliniensis*. Gene 2000;242(1-2):393-398.
- Stallybrass F. *Candida* precipitins. J Pathol Bacteriol 1964;87:89-97.
- Stallybrass F. The incidence of the serological groups of *Candida albicans* in southern England. J Hyg 1964;62:395-399.

- Stanley V, Hurley R, Carroll C. Distribution and significance of *Candida* precipitins in pregnant women. J Med Microbiol 1972;5:313-320.
- Stead R, Cooke N. Adverse effects oh inhaled corticosteroids. Br Med J 1989;298:403-404.
- Stenderup A, Back A. Desoxyribonucleic Acid Base composition of some species within yhe genus *Candida*. J Gen Microbiol 1968;52:231-236.
- Stenderup A, Schonheyder H. Mycoses complicating AIDS. Microbiol Sci 1981;1:219-223.
- Stenderup A. Ecology of yeast and epidemiology of yeast infections. Acta Derm Venereol 1986;121:27-37.
- Stevens D. Fungal infections in AIDS patients. Br J Clin Practice 1990;44:11-22.
- Stewart-Tull D. Evidence that vaginal lactobacilli do not ferment glycogen. Am J Obstet Gynecol 1964;88:676-679.
- St-Germain G, Beauchesne D. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification Panel. J Clin Microbiol 1991;29(10):2296-2299.
- Stiller R, Bennett J, Scholer H, Wall M, Polak A, Stevens D. Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 1982;22:482-487.
- Stinnett E, Childers N, Wright J, Rodu B, Bradley E Jr. The detection of oral *Candida* in pediatric leukemia patients. Pediatr Dent 1992;14(4):236-239.
- Stinnott J, Cullison J, Sweeney M. *Candida (Torulopsis) glabrata*. Infect Control 1987;8:334-336.

- Stockman L, Roberts G. Rapid screening method for the identification of *C. glabrata*. Abstr F-80, p. 377. In Abstracts of the 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1985. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Stone H, Kolb L, Currie C, Geheber C, Cuzzell J. *Candida* sepsis: pathogenesis and principles of treatment. *Ann Surg* 1974;179:699-711.
- Stratov I, Gottlieb T, Bradbury R, O'Kane G. Candidemia in an Australian Teaching Hospital: relationship to central line and TPN use. *J Infect* 1998;36:203-207.
- Strausbaugh LJ, Sewell D, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 1994;32(9):2299-2300.
- Strober W, Krakauer R, Kaeveman H, Reynolds H, Nelson D. Secretory component deficiency. *New Engl J Med* 1976;294:351-356.
- Sullivan D, Bennett B, Henman M, *et al.* Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1993;31:2124-2133.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: An emerging opportunistic pathogen. *Current Topics in Medical Mycology* 1997;8(1-2):15-25.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):329-334.
- Sullivan D, Haynes K, Bille J *et al.* Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 1997;35 (4):960-964.

- Sullivan D, Henman M, Moran G *et al.* Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. *J Med Microbiol* 1996;44:339-408.
- Sullivan D, Westerneng T, Haynes K, Bennett D, Coleman D. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* 1995;141:1507-1521.
- Sweeney M, Bagg J, Baxter W, Aitchison T. Oral disease in terminally ill cancer patients with xerostomia. *Oral Oncology* 1998;34:123-126.
- Sweet C, Kaufman L. Application of agglutinins for the rapid and accurate identification of medically important *Candida* species. *Appl Microbiol* 1970;19:830-836.
- Sylvester D. Candidosis and oral contraception. *Practitioner* 1986;230:299.
- Tack C, Santman F. Results of intensive care treatment in patients with hematologic malignancies; relation to infections. *Ned Tijdschr Geneesk* 1992;136(1):25-29.
- Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, Fujita S, Sano K, Yamamoto E, Sugano M, Awane M, Yamaoka Y, Kumada K, *et al.* Living related liver transplantation in children. *Am J Surg* 1994;168(1):41-48.
- Tang Y, Persing D. Molecular detection and identification of microorganisms. En Murray P, Baron E, Pfaller M, Tereover F, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology* ASM Press 1999. pp 215-244.
- Tang Y, Procop G, Persing D. Molecular diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43:2021-2038.

- Tanner A, Maiden M, Lee K, Shulman L, Weber H. Dental implant infections. Clin Infect Dis 1997;25(suppl 2):S213-S217.
- Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens and treatment. Clin Infect Dis 1993;16(suppl 4):S304-309.
- Tapper-Jones L, Aldred M, Walker D, Hayes T. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics. J Clin Pathol 1981;34:706-711.
- Tapper-Jones L, Aldred M, Walker D. Prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in Sjögren's syndrome. J Clin Pathol 1980;33:282-287.
- Taschdjian C.L, Burchall J.J, Kozinn P.J Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. Am J Dis Child 1960;99:212-215.
- Taschdjian C.L, Kozinn P, Toni E. Opportunistic yeast infection, with special reference to candidiasis. Ann N Y Acad Sci 1970;174:606-622.
- Tausch I, Tietz J, Harwardt K, Meyer R, Klug C, Staffa G. Fluconazole in the treatment of systemic yeast mycoses. Mycoses 1992;35:27-33.
- Tavitian A, Raufman J, Rosenthal L, Weber J, Webber C, Dincsoy H. Ketoconazole resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Gastroenterology 1986;90:443-445.
- Tavitian A, Raufman J, Rosenthal L. Oral candidiasis as a marker for esophageal candidiasis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1986;104:54-55.
- Taylor G, Buchanan-Chell M, Kirkland T, McKenzie M, Wiens R. Trends and sources of nosocomial fungaemia. Mycoses 1994;37(5-6):187-190.

- Teanpaisan R, Nittayananta W. Prevalence of *Candida* species in AIDS patients and HIV-free subjects in Thailand. *J Oral Pathol Med* 1998;27(1):4-7.
- Tewari S, Fletcher R. The efficacy of mysteklin and tetracycline. *Br J Clin Pract* 1966;20:639-641.
- Thomas E, Reddy K. Cimetidine therapy and duodenal candidiasis. *Gastrointest Endosc* 1985;31:52.
- Thomas E, Reddy K. Non-healing duodenal ulceration due to *Candida*. *J Clin Gastroenterol* 1983;5:55-58.
- Thomas M, Lang S. Intravascular cannula-related sepsis: two years' experience. *N Z Med J* 1985;98:804-806.
- Thompson S, Kola H, Langenegger J, Reyneke J. Oronasal fistula secondary to nasal septal surgery and candidiasis. *J Oral Maxillofac Surg* 1985;43:964-966.
- Tierno P, Milstoc M. Further evaluation of germ-tube-positive *Candida tropicalis*. *Am J Clin Pathol* 1979;71:131.
- Tierno P, Milstoc M. Germ-tube positive *Candida tropicalis*. *Am J Clin Pathol* 1978;69:366-369.
- Tietz H, Küssner A, Thanos M, Pinto de Andrade M, Presber W, Schönián G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2462-2465.
- 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(4):1599-1608.
- Tomoda T, Nakano Y, Kageyama T. Variations in intestinal *Candida* populations in patients receiving antileukemic therapy. *Bull Osaka Med Sch* 1984;30:14-18.

- Tomsiková A, Tomaierová V, Kotál L, Novácková D. An immunologic study of vaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet* 1980;18:398-403.
- Toogood J, Jennings B, Baskerville J, Anderson J, Johansson S. Dosing regimen of budesonide and occurrence of oropharyngeal complications. *Eur J Respir Dis* 1984;65:35-44.
- Topozada M, Amer S, El-Ghazzawi E. Effect of subdermal levonorgestrel contraceptive implants on vaginal candidiasis. *Adv Contracept* 1986;2:117-122.
- Tornos P, Sanz E, Permanyer-Miralda G, Almirante B, Planes A, Soler-Soler J. Late prosthetic valve endocarditis. Immediate and long-term prognosis. *Chest* 1992;101(1):37-41.
- Torres Rojas J, Stratton C, Sander C, *et al.* Candidal suppurative peripheral thrombophlebitis. *Ann Inter Med* 1982;96:431-435.
- Torres-Rodríguez J, Carceller A. Factores de patogenicidad en *Candida*. *Rev Iberoamer Micol* 1993;S1:2-7.
- Torres-Rodríguez J, Montsant-Montané L, Madrenys-Brunet N. Identificación de levaduras del género *Candida* por un sistema de inhibición del crecimiento: Microring YT. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12:439-442.
- Torres-Rodríguez J, Nicolás M, Madrenys N, Gallach C. Distribution of serotypes A and B of *Candida albicans* in 502 strains isolated from pathological specimens. *Med Clin (Barc)* 1991;97(1):1-3.
- Torssander J, Morfeldt-Mansson L, Biberfeld G, Karlsson A, Putkonen P, Wasserman J. Oral *Candida albicans* in HIV infection. *Scand J Infect Dis* 1987;19:291-295.

- Torssander J, Wasserman J, Morfeldt-Mansson L, Petrini B, Von Stedingk L. Persistent generalized lymphadenopathy: immunological and mycological investigations. *Acta Derm Venereol* 1985;65:515-520.
- Triger D, Goepel J, Slater D, Underwood J. Systemic candidiasis complicating acute hepatic failure in patients treated with cimetidine. *Lancet* 1981;2:837-838.
- Trilla A. Epidemiology of nosocomial infections in adult intensive care units. *Intensive Care Med* 1994;20(suppl 3):S1-S4.
- Trousseau A. Lectures on Clinical Medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. Trans by Cormack J R (ed) from 1868 ed. New Sydenham Society, London 1869. pp 2.
- Tsuchiya T, Fukazawa Y, Kawakita S. Serological classification of the genus *Candida*. In: Studies on candidiasis in Japan. Research Committee of candidiasis, Tokyo 1961. pp 34-46.
- Tsuchiya T, Fukazawa Y, Taguchi M, Nakase T, Shinoda T. Serological aspects on yeast classification. *Mycopathol Mycol Appl* 1974;53:77-91.
- Tsunezuka Y, Urayama H, Ohtake H, Waanabe Y. A solitary iliac artery aneurysm caused by *Candida* infection. Report of a case. *J Cardiovasc Surg* 1998;39:1-3.
- Tubaro E, Borelli G, Croce G, Cavallo G, Santiangeli C. Effect of morphine on resistance to infection. *J Infect Dis* 1983;148:656-666.
- Tumbarello M, Tacconelli E, de Gaetano Donati K, Morace G, Fadda G, Cauda R. Candidemia in HIV-infected subjects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(7):478-483.
- Tylenda C, Larsen J, Yeh C, Lane H, Fox P. High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med* 1989;18(9):520-524.

- Ulla M, Campos A, Baranda J, San Juan I, del Villar V, Merino F, Larumbe M, Gómez J. Sexually transmitted diseases in a high risk subpopulation from the province of Soria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11(6):299-303.
- Underwood M. A treatise on the disease of children. J Mathews, London 1784. pp 43.
- Upadhyay M, karmacharya P, Koirala S, Tuladhar N, Bryan L, Smolin G, Whitcher J. Epidemiologic characteristics, predisposing factors, and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal. *Am J Ophthalmol* 1991;111(1):92-99.
- Valeri A, Radhakrishnan J, Vernocchi L, Carmichael L, Stern L. The epidemiology of peritonitis in acute peritoneal dialysis: a comparison between open-and closed- drainage systems. *Am J Kidney Dis* 1993;21(3):300-309.
- Van Rensburg H, Odendaal H. The prevalence of potential pathogenic micro-organisms in the endocervix of pregnant women at Tygerberg Hospital. *S Afr Med J* 1992;81(3):156-157.
- Van Uden N, Buckley H. *Candida* Beckhout. In: Lodder J (ed.). The yeasts. North Holland, Amsterdam 1970. pp 893-1087.
- Vandem Bossche H. From garlic to ergosterol biosynthesis inhibitors. En: Iwata K. Vandem Bossche. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Amsterdam. Elsevier. 1986. pp 1-10.
- Vandenbussche M, Swinne D. Yeasts oral carriage in denture wearers. *Mykosen* 1984;27:431-435.
- Velegraki A, Logotheti M. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20:239-241.

- Veraldi G, Guglielmi A, Genna M, Bertolini P, Pasetto E, Dusi R, Cordiano C. Occlusion of the common iliac artery secondary of fungal endocarditis: report of a case. *Surg Today* 2000;30(3):291-293.
- Vergheze S, Mullasari A, Padmaja P, Sudha P, Sapna M, Cherian K. Fungal endocarditis following cardiac surgery. *Indian Heart J* 1998;50(4):418-422.
- Vergheze S, Padmaja P, Sudha P, Johni D, Vasu S. Central venous catheter related infections. *J Commun Dis* 1999;31(1):1-4.
- Véron. Memoire sur le Muguet. *Arch Gen Med* 1835;8:466.
- Verrina E, Edefonti A, Bassi S, Perfumo F, Zacchello G, Andreetta B, Caringella D, Lavoratti G, Picca M, Rinaldi S, *et al.* Peritonitis in children undergoing chronic peritoneal dialysis (CPD): data from the Italian Registry of Pediatric CPD. *Adv Perit Dial* 1992;8:419-422.
- Verweij P, Breuker I, Rijs A, Meis J. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 1999;52(4):271-273.
- Vidotto V, Clerico M, Franzin I, Luchini L, Sinicco A. Fungal colonization in patients with cancer of the upper respiratory tract. *Mycopathologia* 1986;96:97-102.
- Vidotto V, Guevara Ochoa L, Ponce L, Tello G, Prada G, Bruatto M. Vaginal yeast flora of pregnant women in the Cusco region of Peru. *Mycoses* 1992;35(9-10):229-234.
- Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for the research and treatment of cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 1999;28(5):1071-1079.

- Vogt F. The incidence of oral candidiasis with use of inhaled corticosteroids. *Ann Allergy* 1979;43:205-210.
- Voros-Balog T, Dombi C, Vincze N, Banoczy J. Epidemiologic survey of tongue lesions and analysis of the etiologic factors involved. *Fogorv Sz* 1999;92(5):157-163.
- Voss E, *et al.* International Code of Botanical Nomenclature (Adopted by the 13th International Botanical Congress, Sydney, August 1981). Dr W Junk Publishers. The Hague/Boston. 1983.
- Wadlin J, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1967-1970.
- Wagar E. Direct hybridization and amplification applications for the diagnosis of infectious diseases. *J Clin Lab Anal* 1996;10:312-325.
- Waggoner-Fountain L, walker M, Hollis R, Pfaller M, Ferguson J 2end, Wenzel R, Donowitz L. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin Infect Dis* 1996;22(5):803-808.
- Waldman H. Pediatric AIDS epidemic reflects the first half million AIDS cases in the US. *ASDC J Dent Child* 1996;63:89-94.
- Waller J, Koenig M, Debruyne M, Contant G. Evaluation d'un nouveau milieu d'isolement des levures et de diagnostic rapide de *Candida albicans*. *Rev Fr Lab* 1993;252:89-92.
- Walsh H, Hildebrandt R, Prystowsky H. Oral progestational agents as a cause of *Candida vaginitis*. *Am J Obstet Gynecol* 1968;101:991-993.

- Walsh T, Hier D, Caplan L. Fungal infections of the central nervous system: comparative analysis of risk factors and clinical signs in 37 patients. *Neurology* 1985;35:1654-1657.
- Walsh T, Lee J, Roilides E, Pizzo P. Recent progress and current problems in management of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. *Clin Infect Dis* 1993;17(suppl 2):5468-5480.
- Walsh T, Lee J, Roilides E, Pizzo P. Recent progress and current problems in management of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. *Curr Opin Oncol* 1992;4(4):647-655.
- Walsh T, Melcher G, Rinaldi M, Lecciones J, McGouhg D, Kelly P, Lee P, Callender D, Rubin M, Pizzo P. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1990;28:1616-1622.
- Walsh T, Pizzo P. Nosocomial fungal infections: a classification for hospital-acquired fungal infections and mycoses arising from endogenous flora or reactivation. *Annu Rev Microbiol* 1988;42:519-545.
- Warnock D.W. Typing of *C. albicans*. *J Hosp Infect* 1984;5:244-252.
- Warren J. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11(3):609-622.
- Warren N, Hazen K. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. En Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology* ASM Press 1999. pp 1184-1192.
- Warren N, Shadomy H. Yeasts of medical importance. In *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Ed. Balows A, Hausler W, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy H. Eds Amer Soc Microbiol, Washington, D C. 1991. pp 617-629.

- Watson R. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. In Methods in microbiology. Norris J, Ribbons D. Eds Academic Press, New York, NY. 1976;9:1-14.
- Wehrspann P. Reliability of the Uni-Yeast-Tek system in the routine diagnosis of pathogen yeasts. Mykosen 1982;25(11):599-605.
- Wenzel R, Pfaller M. *Candida* species: emerging hospital bloodstream pathogens. Infect Control Hosp epidemiol 1991;12:523-524.
- Wenzel R. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. Clin Infect Dis 1995;20(6):1531-1534.
- Wetmur J. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991;26:227-259.
- Weymann L, Stager C, Qadri S, Villarreal A, Qadri S. Evaluation of a modified dye pour-plate auxanographic method for the rapid identification of clinically significant yeasts. Comparison with two commercial systems. Med Microbiol Immunol (Berl) 1979;167(1):11-20.
- White T, madej J, Persing D. The polymerase chain reaction: clinical applications. Adv Clin Chem 1992;29:161-196.
- Wickerham L, Burton K. J Bacteriol 1948;56:363-371.
- Wickerham L. Apparent increase in frequency of infection involving *Torulopsis glabrata*. J Am Med Assoc 1957;165:47-48.
- Wied G, Davis M, Frank R, Segal P, Meier P, Rosenthal E. Statical evaluation of the effect of hormonal contraceptives on the cytologic smear pattern. Obstet Gynecol 1966;27:327-334.

- Wilkieson C, Samaranayake L, MacFarlane T, Lamey P, MacKenzie D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991;20(1):13-16.
- Wilkinson J. Some remarks upon the development of epiphytes with the description of new vegetable formation found in connection with the human uterus. *Lancet* 1849;2:448.
- Willemsen M, Breynaert J, Lauwers S. Comparison of Auxacolor with API 20C Aux in yeast identification. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:369-375.
- Williams A. Women in the HIV epidemic. *Crit Care Nurs Clin North Am* 1992;4(3):437-445.
- Williams R, Chandler J, Orloff M. *Candida* septicemia. *Arch Surg* 1971;103:8-11.
- Willinger B, Manafi M, Rotter M. Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol* 1994;18:47-49.
- Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 1999;42(1-2):61-65.
- Willis A, Coulter W, Fulton C, Hayes J, Bell P, Lamey P. Oral candidial carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. *Diabet Med* 1999;16(8):675-679.
- Willis A, Coulter W, Hayes J, Bell P, Lamey P. Factors affecting the adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells of insulin-using diabetes mellitus patients. *J Med Microbiol* 2000;49(3):291-293.
- Willis A, Coulter W, Sullivan D, Coleman D, Hayes J, Bell P, Lamey P. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med* 2000;29(2):86-90.

- Wingard J, Dick J, Merz W, Sandford G, Saral R, Burns W. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun* 1982;37:833-836.
- Wingard J, Merz W, Rinaldi M, Jonhsson T, Karf J, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with Bone Marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *New England J Med* 1991;325:1274-1277.
- Wingard J, Merz W, Rinaldi M, Miller C, Karp J, Saral R. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1847-1849.
- Wingard J. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995;20:115-125.
- Winkelman M, Galloway P. Central nervous system complications of thermal burns. A postmortem study of 139 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992;71(5):271-283.
- Winner HJ, Hurley R. *Candida albicans*. Londres: Churchill. 1964.
- Winston D, Gale R, Meyer D, Young L. Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine* 1979;58:1-31.
- Wolfson N, Samuels B, Riley J. A three-day treatment regimen for vulvovaginal candidiasis. *J La State Med Soc* 1982;134:28-31.
- Wong P, Mak S, Lo K, Tong G, Wong A. A retrospective study of seven cases of *Candida parapsilosis* peritonitis in CAPD patients: the therapeutic implications. *Perit Dial Int* 2000;20(1):76-79.
- Wright W, Wenzel R. Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* 1997 Jun;11(2):411-425.

- Wu D, Wallace R. The ligation amplification reaction (LAR) –amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989;4:560-569.
- Yacono J. Type I herpes simplex esophagitis with candidal esophagitis in an immunocompetent host. *N Y State J Med* 1985;85:656-658.
- Yaffee H, Grots I. Moniliasis due to norethynodrel with mestranol. *New Eng J Med* 1965;272:647.
- Yaffee H. Dermal candidiasis the immobilized. *New Engl J Med* 1973;289:1203.
- Yamamura D, Rotstein C, Nicolle L, Ioannou S. Candidemia at selected Canadian sites: results from the fungal disease registry, 1992-1994. Fungal disease registry of the canadian infectious disease society. *CMAJ* 1999;160(4):493-499.
- Yamane N, Koontz F, Lindsey M, Hirst V. Comparison of the Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) with the updated data base to the API 20 C for the identification of yeast, abstr. C-233, p. 382. Abstr. 90th Annu Meet Am Soc Microbiol 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990
- Yarrow D, Meyer S. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom cons. *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:611-615.
- Yates A, Mehrotra D, Moffitt J. *Candida* endocarditis in a child with hyperimmunoglobulinemia E syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:770-772.
- Yeo E, Alvarado T, Fainstein V, Bodey G. Prophylaxis of oropharyngeal candidiasis with clotrimazole. *J Clin Oncol* 1985;3:1668-1671.
- Young R, Bennett J, Geelhoed G, Levine A. Fungemia with compromised host resistance. *Ann Intern Med* 1974;80:605-612.

- Yuen K, seto W, Ching T, Cheung W, Kwok Y, Chu Y. An outbreak of *Candida tropicalis* peritonitis in patients on intermittent peritoneal dialysis. J Hosp Infect 1992;22(1):65-72.
- Zai S, Khan S, Gillani J. Candidiasis in cancer patients. JPMA J Pak Med Assoc 1997;47(7):191-192.
- Zanini V, Viviani M, Cava L, Tortorano A, Villa F. *Candida* infections in the burn patients. Panminerva Med 1983;25:163-166.
- Zapata-Sirvent R, Wang X, Miller G, Davies J, Sun Y, Zhang M, Cao D, Ma R. *Candida* infection in severe burns. Burns Inc Therm Inj 1985;11:330-336.
- Zegarelli E, Kutscher A. Oral moniliasis following intraoral topical corticosteroid therapy. J Oral Ther 1964;1:304-307.
- Zenati M, Dowling R, Dummer J, Paradis I, Arena V, Armitage J, Kormos R, Hardesty R, Griffith B. Influence of the donor lung on development of early infections in lung transplant recipients. J Heart Transplant 1990; 9(5):502-509.
- Zenker W. Encephalitis mit Pilzentwicklung im Gehirne. Jahrb Ges Natur-u-Heik (Dresden) 1862. pp 51-52.
- Zettergren L. Thresher's lung (Pulmonary moniliasis). An experimental investigation. Upsala Läk Foren Fårh 1950;55:257-313.
- Zimmerman L. Fatal fungus infections complicating other diseases. Am J Clin Pathol 1955;25:46-65.
- Zopf W. Die Pilz im Morphologischer, Physiologischer, Biologischer Beziehung. Breslau, Trewendt. 1890.

Zouaghi H, Savu L, Delorme J, Kleink-Necht D, Nuñez E. Loss of serum transcortin in human shock associated with severe infection by *Candida albicans*. Acta Endocrinol (Copenh) 1983;102:277-283.