

Identificación molecular y perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados

Molecular identification and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from ambulatory and hospitalized patients

Carolina Duré¹, Margarita Samudio¹, Norma Fariña², Sonia Abente¹, Alicia Pereira², Rosa Guillén¹, Gustavo Aguilar³, Belén Gayoso¹, Heriberto Nuñez⁴, Desiré Almirón⁵, Aurelia Taboada⁵

¹ Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay.

² Laboratorio San Roque, Asunción, Paraguay.

³ Instituto de Previsión Social, Asunción, Paraguay.

⁴ Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Odontología, Asunción, Paraguay

⁵ Instituto de Medicina Tropical, Programa Nacional de Control de VIH/Sida e ITS (PRONASIDA), Asunción, Paraguay.



Recibido: 24/04/2024

Revisado: 18/05/2024

Aceptado: 29/08/2024

Autor correspondiente

Margarita Samudio, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

margarita.samudio@gmail.com

Editor Responsable

Gladys Estigarribia, PhD, Universidad Nacional de Caaguazú, Coronel Oviedo, Paraguay

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiación

Este estudio recibió fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación (FEEI), Paraguay, Proyecto número PINV15-919.

Este artículo es publicado bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



RESUMEN

Introducción: *C. albicans* junto con *C. dubliniensis* y *C. africana*, forman el Complejo *Candida albicans*. Estas especies están estrechamente relacionadas entre sí, lo que dificulta la diferenciación por métodos convencionales. **Objetivos:** Diferenciar por método molecular *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en aislamientos de pacientes ambulatorios y hospitalizados de Central, Paraguay y conocer el perfil de sensibilidad de los mismos. **Metodología:** Se incluyeron levaduras aisladas de materiales respiratorios, cavidad bucal, secreciones purulentas, sangre, orina y otros. Se realizó una PCR dúplex de punto final a los aislamientos que desarrollaron coloración verdosa en medio cromogénico (CONDA®, España). El ADN se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA (Promega, EE. UU.) con algunas modificaciones. La sensibilidad a antifúngicos se determinó por VITEK® 2 a un subgrupo de aislamientos. **Resultados:** De 1065 aislamientos, 838 (78,7 %) fueron *C. albicans* y 3 (0,3 %) *C. dubliniensis*, estos últimos provenientes de cavidad bucal; los 224 restantes fueron negativos para ambas especies. El 94,4 % de 503 aislamientos de *C. albicans* fueron sensibles a fluconazol, 97,6 % a voriconazol, 99,4 % a anfotericina B, 100 % a caspofungina y micafungina. Los tres aislamientos de *C. dubliniensis* presentaron CIM de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ frente a fluconazol, $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$ a voriconazol y $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ a anfotericina B. **Discusión:** La frecuencia de *C. dubliniensis* es baja con relación a otros estudios que informan valores de 1,5 a 32 %. Estos aislamientos no presentaron indicios de resistencia. *C. albicans* mostró buena sensibilidad a los antifúngicos ensayados.

Palabras clave: *Candida albicans*; *Candida dubliniensis*; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Pruebas de Sensibilidad Microbiana; Antifúngicos; Paraguay.

ABSTRACT

Introduction: *C. albicans* together with *C. dubliniensis* and *C. Africana*, form the *Candida albicans* Complex. These species are closely related to each other, making differentiation by conventional methods difficult. **Objectives:** To differentiate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by molecular method in isolates from outpatients and hospitalized patients from Central, Paraguay and to know their susceptibility profile. **Methods:** Yeasts isolated from respiratory materials, oral cavity, purulent secretions, blood, urine and others were included. An end-point duplex PCR was performed on the isolates that developed greenish coloration in chromogenic medium (CONDA®, Spain). DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Kit (Promega, USA) with some modifications. Antifungal susceptibility was determined by VITEK® 2 to a subgroup of isolates. **Results:** Of 1065 isolates, 838 (78,7 %) were *C. albicans* and 3 (0,3 %) *C. dubliniensis*, the latter coming from the oral cavity; the remaining 224 were negative for both species. 94,4 % of 503 *C. albicans* isolates were susceptible to fluconazole, 97,6 % to voriconazole, 99,4 % to amphotericin B, 100 % to caspofungin and micafungin. The three isolates of *C. dubliniensis* presented MICs of $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ against fluconazole, $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$ against voriconazole and $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ against amphotericin B. **Discussion:** The frequency of *C. dubliniensis* is low compared to other studies that report values of 1,5 to 32 %. These isolates did not exhibit signs of resistance. *C. albicans* exhibited good susceptibility to antifungals tested.

Keywords: *Candida albicans*; *Candida dubliniensis*; Polymerase Chain Reaction; Microbial Susceptibility Tests; Antifungal Agents; Paraguay

INTRODUCCIÓN

Candida es un hongo presente en la microbiota normal humana del aparato gastrointestinal, vagina, piel y otras mucosas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales o alteraciones de la inmunidad del huésped, esta levadura expresa factores de virulencia y se convierte en patógeno causando infecciones oportunistas (superficiales o sistémicas), que comprenden candidiasis orofaríngea, genital, ocular, cutánea y diseminada, especialmente en pacientes con inmunosupresión (1–3). La especie más patógena del grupo es *Candida albicans* y sigue siendo la levadura aislada con mayor frecuencia en muestras clínicas (4).

Con el avance de los estudios moleculares y filogenéticos se han reclasificado especies atípicas de *C. albicans* con similitudes fenotípicas como la producción de tubo germinativo, entre ellas, *Candida dubliniensis* y *Candida africana*. Estas tres especies forman un complejo de especies denominado Complejo *Candida albicans*. Aunque para *C. africana* la posición taxonómica aún es controversial, algunos autores lo consideran como un biovar de *C. albicans* (5,6).

En Paraguay existen escasos reportes de la frecuencia y distribución de *C. dubliniensis* en la población, probablemente debido a la falta de disponibilidad de métodos específicos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en laboratorios de rutina. Gayoso et al. 2021 reporta 0,4 % (1/278) de esta especie en la cavidad oral de pacientes con VIH (7). No se ha evaluado la frecuencia de esta especie en materiales clínicos diferentes.

El objetivo general de esta investigación fue identificar molecularmente *C. albicans* y *C. dubliniensis*, conocer el perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos provenientes de diferentes orígenes clínicos, de esta forma contribuir con el conocimiento epidemiológico y la vigilancia de levaduras emergentes, importante para la implementación de estrategias terapéuticas adecuadas, especialmente en los pacientes susceptibles de sufrir infecciones por hongos oportunistas como son los inmunocomprometidos.

METODOLOGÍA

Diseño

Estudio observacional descriptivo de corte transversal. Se incluyeron levaduras que desarrollaron coloración verdosa a partir de un cribado en medio cromogénico

(CONDA®, España), provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios, entre agosto del 2016 a diciembre del 2020, remitidas al Departamento de Microbiología del IICS-UNA de otros centros del país. Los aislamientos de levaduras no viables o de color diferente a verde en medio cromogénico fueron excluidas del estudio. Extracción del ADN: Se realizó con el kit comercial Wizard® Genomic DNA (Promega, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones, como la resuspensión de colonias subcultivadas en agar Sabouraud glucosado en 300 µL del buffer de lisis, al cual se agregó perlititas de vidrio de 0,5 mm. Los tubos se agitaron a máxima velocidad por 1 min y luego se pasaron por baño de hielo 1 min (repetiendo estos dos pasos una vez más), continuando con las instrucciones del fabricante. Por último, el ADN extraído se conservó a -20 °C hasta su uso.

PCR dúplex de tiempo final: Se utilizó el método descrito por Ahmad et al., 2012, utilizando cebadores para la amplificación específica del ADN ribosómico (ADNr) de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (8). Controles: Se utilizó ADN de dos cepas controles positivos; para *C. albicans* (ATCC 90028) y para *C. dubliniensis* (cepa 11/2020), cedida por la sección de Micología del Laboratorio Central de Salud Pública y que fuera enviada por el Instituto MALBRÁN como parte del programa Latinoamericano de Control de Calidad en Micología para Laboratorios de Referencia. Las cepas fueron mantenidas en BHI glicerol por sus siglas en inglés (*Brain Heart Infusion*) a -80 °C. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción sin la adición de ADN. Cada control se ensayó por triplicado.

Condiciones de Reacción: La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Simpli Amp™ Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.) siguiendo las condiciones descritas por Ahmad et al. (2012) con algunas modificaciones en un volumen final de 15 µL; las concentraciones finales fueron: 1X de buffer, 100 µM de cada desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada uno de los cebadores CALF/CALR y CDUR/CDUF y 0,5 U de Taq polimerasa (*Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.). A la mezcla se adicionó 2 µL de 10 ng/µL de ADN.

Detección del producto de amplificación: La visualización de los productos de extensión se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. Con buffer de siembra, se colocó 5 µL de cada amplificado y 5 µL de un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (pb) (*Jenna Bioscience*, Alemania). La corrida se realizó en buffer TAE 1X y las condiciones electrolíticas utilizadas fueron 30 min a 100 Voltios. Las bandas se

revelaron utilizando un agente para visualización de ADN en geles Syber Safe DNA gel stain Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), 6 µL por cada 100 mL de solución de agarosa al 1,5 %. Las bandas se evidenciaron en un transiluminador UV Digimage System GDS-01 (mrc, Israel) y se capturaron las imágenes con cámara fotográfica.

Determinación de susceptibilidad antifúngica: Se estudió la susceptibilidad a 503 (60 %) de los aislamientos de *C. albicans* y a los tres aislamientos de *C. dubliniensis* por el método automatizado VITEK® 2.

Los antifúngicos ensayados para *C. albicans* fueron: fluconazol, voriconazol, anfotericina B, caspofungina y micafungina; y para *C. dubliniensis* los tres primeros antifúngicos. Se utilizaron las tarjetas AST-YS07 (bioMérieux, Francia), que contienen un panel de diluciones seriadas de fluconazol (1 a 64 µg/mL), voriconazol (0,12 a 8 µg/mL), anfotericina B (0,25 a 16 µg/mL), micafungina (0,06 a 4 µg/mL) y caspofungina (0,25 a 4 µg/mL). Cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 se utilizaron como control de las tarjetas. Según lo establecido por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) se consideraron resistentes a fluconazol los aislamientos de *C. albicans* que dieron CIM ≥ 8 µg/mL, y resistentes a voriconazol, caspofungina y micafungina los que presentaron CIM ≥ 1 µg/mL, documento M27M44S del CLSI, 2022 (9). Para la anfotericina B se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos, documento M59 del CLSI, 2018 (10) el cual categoriza en aislados silvestres los que presentan CIM ≤ 2 µg/mL, y no silvestres los de CIM > 2 µg/mL.

Gestión y análisis de los datos

Los datos fueron consignados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® y posteriormente analizados con el paquete estadístico Epi Info versión 7.2.5.0. Se utilizó estadística descriptiva para resumir los datos como frecuencia absoluta y relativa porcentual.

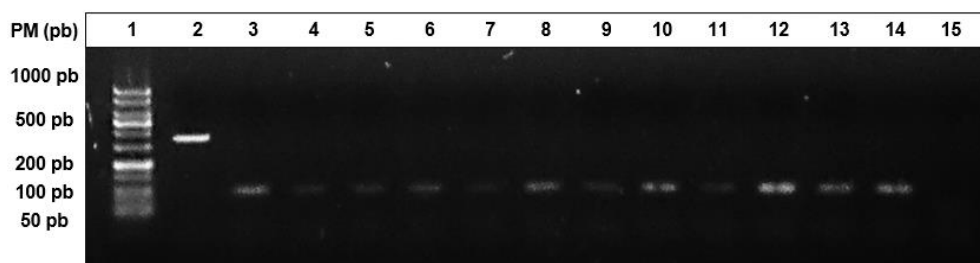
Consideraciones éticas

El Protocolo código P19/2019 fue aprobado por el Comité Científico y de Ética del IICS-UNA. Solo los investigadores tuvieron acceso a los datos de los pacientes, que permanecieron confidenciales y codificados durante el estudio.

RESULTADOS

Se estudió 1065 colonias que presentaron coloración verdosa en el medio cromogénico, La especie más frecuentemente identificada fue *C. albicans*, 838 de 1065 aislamientos, 78,7 % IC 95 (76,12 - 81,04), tres aislamientos fueron *C. dubliniensis*, 0,3 % IC 95 (0,10 - 0,82), y los restantes 224 aislamientos (21,0 %) fueron negativos para ambas especies. Se evidenció bandas de tamaño característico, aproximadamente 100 pb para *C. albicans* y 325 pb para *C. dubliniensis* como se observa en la [Figura 1](#). Corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5 %. Carril 1: PM (peso molecular) de 50 bp; Carril 2: control positivo *C. dubliniensis* (325 pb); Carril 3: control positivo *C. albicans* (100 pb); Carriles 4-14: muestras positivas para *C. albicans* (100 pb); Carril 15: control negativo.

FIGURA 1. PCR DÚPLEX CONVENCIONAL DE AISLAMIENTOS DE PACIENTES



Estos aislamientos provinieron de 879 pacientes, 740 pacientes presentaron aislamientos únicos y 139 mixtos; de estos últimos se obtuvieron 325 aislamientos. El origen de los aislamientos correspondió a muestras clínicas diversas, en su mayoría materiales respiratorios y orina como se

observa en la [Tabla 1](#). El 44,6 % de los aislamientos provenían del Instituto de Previsión Social, 23,4 % del Laboratorio San Roque, 20,9 % Instituto de Medicina Tropical (IMT)/ Programa Nacional de Control de Sida-ITS (PRONASIDA), 6,6 % del IICS - UNA y 4,6 % de la Clínica de la Facultad de Odontología – UNA. Los

pacientes presentaron una media de edad de 23 años (0 a 99 años), 52,5 % correspondió al sexo femenino. El 20,9 % (222/1065) de los aislamientos eran provenientes de pacientes inmunocomprometidos con HIV (pacientes de IMT/PRONASIDA) y el 79,1 %

restante de pacientes aparentemente inmunocompetentes de otros centros. Del total de aislamientos, 68,3 % (727/1065) provenían de pacientes internados y el resto de pacientes ambulatorios.

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE *C. ALBICANS* Y *C. DUBLINIENSIS* SEGÚN EL ORIGEN

Origen de la muestra	PCR dúplex positivo n (%)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Material respiratorio ^a	225 (26,8)	
Orina	189 (22,5)	
Hisopado Faríngeo ^b	187 (22,3)	1 (33,3)
Secreciones varias ^c	83 (9,9)	
Cavidad bucal ^d	54 (6,4)	2 (66,7)
Sangre	53 (6,3)	
Catéter	26 (3,1)	
Piel y anexos	22 (2,6)	
Total	838 (100)	3 (100)

^a BAL, esputo, secreción traqueal; ^b con y sin lesión; ^c abscesos, secreciones genitales; ^d dentina, placa, saliva, hisopado dientes.

De los tres aislamientos de *C. dubliniensis*. Dos provenían de muestras de dentina (un paciente del sexo masculino y otro femenino, aparentemente inmunocompetentes); y un aislamiento de hisopado faríngeo de una paciente inmunocomprometida con HIV que no presentaba lesión, y con estadio CD4 200 a 500 cel/uL. Todos los aislamientos de *C. dubliniensis* provenían de pacientes ambulatorios, con edades aproximadas a 50 años.

Las tres cepas de *C. dubliniensis* desarrollaron una coloración verde casi indistinguible de *C. albicans* a las 48 h de incubación. Las cepas con PCR dúplex negativa para las especies *C. albicans*/*C. dubliniensis*, fueron identificadas por el método comercial VITEK® 2 y correspondieron en un 100 % a especies diferentes de *C. albicans*/*C. dubliniensis* con excelente porcentaje de discriminación de 97 - 99 %, según el análisis de la base de datos del instrumento. Los aislamientos identificados por PCR como *C. dubliniensis* también

fueron identificados correctamente por esta metodología, pero con un porcentaje de discriminación menor, de bueno a muy bueno de 91 - 93 %.

Perfil de sensibilidad de los aislamientos: En la [Tabla 2](#) se observa la distribución de los valores de CIM por el método VITEK® 2, ensayados frente a los 503 (60 %) aislamientos de *C. albicans*. Debido a la baja frecuencia de *C. dubliniensis* el número de muestras del estudio tuvo que ser aumentado, por lo que el 60 % de los aislados de *C. albicans* fue considerado muy representativo para estimar la susceptibilidad a los antifúngicos.

La CIM frente a los azoles presentó valores bajos en la mayoría de los aislamientos. Las tres cepas de *C. dubliniensis*, presentaron valores de CIM considerados bajos de $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ frente a fluconazol, $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$ frente a voriconazol y $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ frente a anfotericina B, a pesar de no disponer de puntos de cortes clínicos en el CLSI actuales para esta especie.

TABLA 2. PERFIL DE SENSIBILIDAD DE *C. ALBICANS* A LOS ANTIFÚNGICOS DETERMINADA MEDIANTE EL SISTEMA VITEK® 2. N= 503

Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	N° de aislados	Sensibilidad n (%)
Fluconazol	$\leq 0,5$	340	
	≤ 1	121	S 475 (94,4 %)
	2	14	
	4	2	SDD 2 (0,4 %)
	8	16	
	16	8	R 26 (5,2 %)
Voriconazol	32	2	
	$\leq 0,12$	491	S 491 (97,6 %)
	0,25	4	
	0,5	2	SDD 6 (1,2 %)
	1	5	
	4	1	R 6 (1,2 %)

	≤ 0,25	203		
	0,5	226	S	500 (99,4 %)
Anfotericina B	1	69		
	2	2		
	8	1		
	≥ 16	2	R	3 (0,6 %)
Caspofungina	≤ 0,12	365	S	503 (100 %)
	≤ 0,25	138		
Micafungina	≤ 0,06	501		
	0,12	1	S	503 (100 %)
	0,25	1		

DISCUSIÓN

En el presente estudio se reprodujo con éxito la reacción molecular para la diferenciación de las especies *C. albicans*/*C. dubliniensis*, en la que se utilizó como blanco secuencias en las regiones de los espaciadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosómico. En los hongos ITS1 se encuentra entre los genes de ARNr 18S y 5.8S, mientras que ITS2 está entre los genes de ARNr 5.8S y 28S. Estos genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S altamente conservados permiten el diseño de cebadores universales para amplificar las regiones altamente variables ITS1 e ITS2. El uso de estas secuencias permite una discriminación a nivel interespecífica, y logra diferenciar levaduras filogenéticamente cercanas (11).

La PCR dúplex convencional utilizada brinda la identificación simultánea de ambas especies en una sola reacción, es específica y sensible. Si bien esta metodología no requiere pruebas previas como la de formación de tubos germinativos y es adecuada para laboratorios con recursos limitados de microbiología equipados con tecnología de PCR básica, no puede aplicarse directamente sobre materiales clínicos, debido a que requiere de levaduras previamente aisladas. Constituye una ventaja sobre la PCR monoplex que implican dos reacciones separadas para cada especie a investigar u otros métodos que precisan manipulaciones adicionales (como la digestión con enzimas de restricción para generar polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o secuenciación de ADN). Esto puede aumentar el costo de la prueba o precisar tiempo adicional y retrasar los resultados.

Se requiere un tiempo aproximado de 48 h para emitir la identificación final con esta metodología molecular, partiendo de la extracción de ADN de cepas puras de levaduras, la PCR y la electroforesis realizada para la visualización del producto de PCR, un tiempo prolongado con relación a la PCR en tiempo real. El procesamiento de muestras con aislamientos múltiples requiere además un tiempo adicional pues se debe realizar la separación de una cepa pura.

Una limitación del estudio es que no se ensayaron cepas de referencia de otras especies para determinar posibles reacciones cruzadas de esta PCR, a pesar de que la longitud de la región ITS depende de la especie, por lo que es utilizada para determinar variaciones intra e interespecíficas, según lo reportado en varios estudios (11,12). Otro aspecto para considerar es la gran dificultad de la adecuada extracción del ADN de las levaduras debido a la fuerza y elasticidad de la pared celular, en este estudio se combinó un método mecánico con químico para asegurar la extracción adecuada.

Este estudio abarcó un grupo heterogéneo de aislamientos provenientes de diferentes materiales clínicos de pacientes de amplio rango de edad. Se detectó baja frecuencia de *C. dubliniensis*, 0,3 % de los 1065 aislamientos seleccionados y éstos provenían de la cavidad bucal. En nuestro país Gayoso et al. (2021) en un estudio previo reporta similar frecuencia de 0,4 % (1/278) en cavidad oral de pacientes con VIH (7). Este estudio abarca mayor número de pacientes e incluye a aquellos aparentemente inmunocompetentes.

Se han reportado diferentes prevalencias de *C. dubliniensis* según la región geográfica, Al-Sweih et al., 2005 encontraron similar frecuencia de 0,2 % de *C. dubliniensis* en Kuwait, en ese estudio se examinaron 1644 cepas de *Candida* con tubo germinativo positivo, con la diferencia que no provenían de la cavidad bucal sino de muestras de orina y de hisopado vaginal (13). En Brasil, Ribeiro Ribeiro et al., 2015 encontraron 0,81 % en cavidad oral de pacientes infectados por el VIH que estaban en terapia antirretroviral (14). En Argentina, Mariel-Carballo, 2019 reporta una frecuencia mayor, 6 % de *C. dubliniensis* en cavidad oral de 145 pacientes con VIH (15). Al igual que Pineda et al., 2008 reportaron el 6,1 % en 212 aislamientos provenientes de diferentes materiales clínicos (16). En Irán se aisló 26,4 % de esta especie en consumidores de drogas (17) y 15,7 % en pacientes infectados por el VIH (18). En Libya reportan 11 % de *C. dubliniensis* (19) y 9,8 % en Colombia (20), ambos en pacientes con VIH. Estos autores concuerdan con la localización en

cavidad oral al igual que en el presente estudio.

A diferencia de otras especies de *Candida*, *C. dubliniensis* no se ha aislado de muestras no humanas, esto ha llevado a especular que esta especie es exclusiva de humanos y los sitios más frecuentes donde se encuentra son la cavidad oral y el tracto respiratorio superior. Varios estudios informan del hallazgo de esta especie en otras partes del cuerpo, incluyendo sangre, sistema nervioso central, vagina, orina, piel y heces, tanto en pacientes VIH-positivos como en pacientes VIH-negativos (21,22). En este estudio los tres aislamientos provenían de cavidad oral de pacientes ambulatorios. Según Tantivitayakul et al., 2019, no se conoce la implicancia real de *C. dubliniensis* en las infecciones orales, pues se lo ha encontrado tanto en individuos sanos como con candidiasis oral, por lo que son necesarios más estudios para poder establecer alguna asociación. Los reportes hasta la fecha son inconsistentes entre sí, debido probablemente a la variación entre cepas, el número de aislamientos ensayados y la diferencia entre los métodos empleados (23).

Los medios con sustratos cromogénicos son de gran ayuda para la identificación presuntiva, a la vez que permiten reconocer la existencia de infecciones simultáneas por más de una especie. Sin embargo, las colonias se presentan en una gama de colores por lo que la caracterización depende del observador. Por este motivo no siempre es sencillo discriminar entre variaciones de tonalidades de un color para asignar la correspondencia con la especie aislada (16). En este estudio se ha partido de colonias color verde en el medio cromogénico por lo que se pudieron haber perdido aislados atípicos de *C. dubliniensis*, como lo reportado por Albaina et al., 2015 quienes encontraron 34 *C. dubliniensis* característicos y 9 aislados atípicos de los cuales 6 presentaban coloración rosa en el medio Chromagar y 3 aislados no produjeron clamidoconidios ni tubos germinativos, por lo que la prevalencia de *C. dubliniensis* podría ser ligeramente mayor (24).

Las colonias de *C. dubliniensis* presentaron a las 72 h una tonalidad más oscura con relación a *C. albicans*, la observación de la coloración es subjetiva, por lo que se requiere aplicar otras pruebas fenotípicas y estudios moleculares para confirmación. Cabe mencionar que en el presente estudio se realizaron además pruebas fenotípicas a los tres aislamientos de *C. dubliniensis* y a 30 aislamientos de *C. albicans* y se constató que las características que comparten son la formación de tubo germinativo, clamidoconidios y la coloración parecida en el agar cromogénico; las pruebas diferenciales fueron: la termotolerancia a 42°C,

crecimiento en medio hipersalino y la actividad esterasa que dieron positivo para *C. albicans* y negativo para *C. dubliniensis*. Así también, las colonias de *C. albicans* presentaron coloración crema en agar tabaco y aspecto liso en agar semilla de girasol, diferente a lo presentado por *C. dubliniensis*. El estudio microbiológico convencional puede englobar hasta 7 días para la identificación final, por esta razón y por su baja especificidad se sugiere el diagnóstico molecular o proteómico para confirmación de especies.

La frecuencia de *C. dubliniensis* en el estudio es muy baja para determinar el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos. Las tres cepas aisladas presentaron valores de CIM frente a fluconazol, voriconazol y anfotericina B considerados bajos. La mayoría de los estudios coinciden que *C. dubliniensis* se mantiene bastante sensible a los antifúngicos, la resistencia a fluconazol reportada varía entre 3,1 % y 4,8 %, contrario a lo que se había mencionado hacia 1995, año en el que se describió la especie. Las primeras cepas de *C. dubliniensis* de pacientes VIH positivos exhibieron valores elevados de CIM frente a fluconazol, lo que se explica por el uso excesivo de éste azol para la profilaxis de la candidiasis mucocutánea, muy frecuente en la época, debido a que el SIDA era epidémico y la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) apenas comenzaba a estar disponible (25).

Actualmente CLSI no cuenta con puntos de corte clínico para *C. dubliniensis*, solamente existen puntos de corte epidemiológicos. Sin embargo, EUCAST a partir del 2023 estableció el punto de corte clínico para *C. dubliniensis* y de acuerdo con dicha norma los aislamientos del presente estudio son sensibles a fluconazol y a anfotericina B. La sensibilidad a voriconazol no es posible determinar porque los tres aislamientos dieron CIM de voriconazol $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$, que es la concentración mínima utilizada en las tarjetas del VITEK® 2, siendo necesaria una concentración menor, de $0,06 \mu\text{g/mL}$ para establecer el aislado como sensible según EUCAST (26).

C. albicans presentó buena sensibilidad a todos los antifúngicos ensayados, mayor al 94 %, sin embargo la frecuencia de resistencia de *C. albicans* encontrada para los azoles, 5,2 % y 1,2 % a fluconazol y voriconazol respectivamente, es mayor a lo publicado por Zuluaga et al., 2010, donde la especie *C. albicans* presentó 4,8 % SDD, 0 % resistente a fluconazol y 100 % sensible a voriconazol (27), tampoco Al-Sweih et al., 2005 encontraron resistencia frente a fluconazol, voriconazol y anfotericina B (13). En Paraguay, Aguilar et al., 2020 reportan 2,8 % y 0,6 % de *C. albicans* resistentes a fluconazol y voriconazol, de candidemias (28). Una limitación de este estudio es que no se

confirmaron las resistencias con el método de microdilución, a pesar de que el sistema VITEK® 2 tiene muy buena correlación con el método de referencia (29), es importante verificar los aislamientos resistentes por el método de referencia.

Se observó elevada sensibilidad a anfotericina B (99,4 %), la mayor parte de las especies de hongos que causan infección en humanos son sensibles a este antifúngico. Sin embargo, algunas especies de *Candida* como *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* pueden tener sensibilidad disminuida frente a anfotericina B, y especies emergentes como *Candida auris* presentan tasas de resistencia entre el 10 y el 30 % (30). La sensibilidad de *C. albicans* frente a las equinocandinas micafungina y caspofungina fue del 100 %, antifúngicos poco utilizados en Paraguay.

El surgimiento de aislamientos resistentes a los antifúngicos en el género *Candida* plantea la necesidad de identificar las levaduras y determinar la sensibilidad a drogas antifúngicas, especialmente en aquellos casos de fracasos terapéuticos (31). Se reporta que en la comunidad se encuentran cepas no silvestres de *Candida spp*, lo que puede estar relacionado con el uso poco controlado de antifúngicos para tratar las candidiasis vulvo-vaginales en la comunidad. Dado que la mayoría de las infecciones invasoras son causadas por cepas de la microbiota endógena, debería considerarse la inclusión de *Candida spp.* aisladas de pacientes ambulatorios en los estudios de vigilancia, especialmente en los centros de salud que atienden a este tipo de pacientes ya que estas cepas no silvestres portan algún mecanismo de resistencia (31–33).

La PCR dúplex convencional aplicada en este trabajo para la identificación de dos especies del complejo *C. albicans*, es una técnica muy útil para estudios de vigilancia de cepas emergentes, detecta dos especies en una sola reacción de PCR. Si bien esta técnica es más sensible y específica, para confirmar la identidad de estas levaduras, también requiere de un tiempo de procesamiento para el aislamiento del ADN ya que no se aplica directamente a muestras clínicas, existen otras técnicas de PCR más rápidas y aunque los

insumos y reactivos podrían ser menos costosos para procesar la misma cantidad de muestras comparando con sistemas comerciales automatizados, requiere de infraestructura y varios equipamientos específicos no disponibles en un laboratorio de rutina.

Los resultados de esta investigación demuestran la presencia de *C. dubliniensis* en el país en baja frecuencia y no sólo en pacientes inmunocomprometidos. La identificación de las especies involucradas, así como el estudio de la susceptibilidad contribuye al conocimiento epidemiológico que es útil para optimizar el tratamiento, para el desarrollo de nuevos fármacos o la importación de los mismos ya existentes en otros países. Esta vigilancia debería instaurarse tanto en muestras recolectadas de pacientes internados como las que provienen de la comunidad, para implementar medidas oportunas y evitar la diseminación de posibles cepas resistentes.

CONTRIBUCION DE LOS AUTORES

Conceptualización: Margarita Samudio, Carolina Duré, Norma Fariña

Diseño: Margarita Samudio, Carolina Duré, Norma Fariña

Recolección de datos: Carolina Duré, Sonia Abente, Alicia Pereira, Rosa Guillén, Gustavo Aguilar, Belén Gayoso, Heriberto Nuñez, Desiré Almirón, Aurelia Taboada

Análisis de datos: Margarita Samudio, Carolina Duré, Norma Fariña.

Redacción, revisión crítica del artículo y aprobación de su versión final: Carolina Duré, Margarita Samudio, Norma Fariña, Sonia Abente, Alicia Pereira, Rosa Guillén, Gustavo Aguilar, Belén Gayoso, Heriberto Nuñez, Desiré Almirón, Aurelia Taboada

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos están disponibles vía solicitud al autor de correspondencia.

REFERENCIAS

1. Arriola A, Arbo A. Factores de riesgo potenciales en infecciones sistémicas por *Candida* spp. *Rev Inst Med Trop.* 2020;15(2):5-12. <https://doi.org/10.18004/imt/2020.15.2.5>
2. Suárez Álvarez P, Llanos González I, Montoya Ojeda R, Puello Hoyos M, Young Castro G, Reyes Ramos N. Colonización por *Candida* spp. en sujetos diabéticos y no diabéticos. *Rev cuba endocrinol.* 2016;27(1):59-68. [URL](#).
3. Turner SA, Butler G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(9):a01977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>
4. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
5. Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* complexes using one-step multiplex PCR. *BMC Infectious Diseases.* 2018;18(1):480. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3381-5>
6. Shokoohi G, Javidnia J, Mirhendi H, Rasekh-Jahromi A, Rezaei-Matehkolaei A, Ansari S, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal candidiasis: A single-centre experience in Iran. *Mycoses.* 2021;64(7):771-779. <https://doi.org/10.1111/myc.13280>
7. Gayoso B, Samudio M, Duré C, Fariña N, Alfonso L, Franco I, et al. Especies y sensibilidad a antifúngicos de cepas de *Candida* spp. aisladas de la cavidad bucal de pacientes con VIH de Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2021;19(3):12-24. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.03.12>
8. Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel AM, Chandy RM. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC infectious diseases.* 2012;12:230. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-230>
9. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022. Disponible en: <https://clsi.org/>
10. CLSI. Epidemiological Cutoff values for Antifungal Susceptibility Testing, 2nd ed. CLSI supplement M59. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponible en: <https://clsi.org/>
11. Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome.* 2016;59(11):913-932. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>
12. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS.* 2012;109(16):6241-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
13. Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S, Chandy R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses.* 2005;48(5):347-51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01143.x>
14. Ribeiro AL, de Alencar Menezes TO, de Melo Alves-Junior S, de Menezes SAF, Marques-da-Silva SH, Rosário Vallinoto AC. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(1):29-33. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.03.008>
15. Mariel-Carballo G. Phenotypic identification of *Candida dubliniensis* isolated from candidiasis of oral cavity in immunocompromised patients. *Dermatología Rev Mex.* 2019;63(1):14-25. [URL](#).
16. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos: Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev argent microbiol.* 2008;40(4):211-217. [URL](#).
17. Abharian PH, Dehghan P, Abharian PH, Tolouei S. Molecular characterization of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in the oral cavity of drug abusers using duplex polymerase chain reaction. *Current Medical Mycology.* 2018;4(1):12. <https://doi.org/10.18502/cmm.4.1.29>
18. Khedri S, Santos A I. s., Roudbary M, Hadighi R, Falahati M, Farahyar S, et al. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. *Letters in Applied Microbiology.* 2018;67(4):392-399. <https://doi.org/10.1111/lam.13052>
19. Mohamed H, Crema Z, Mokhtar E, Ellabib M, El Magrahi H, Eshwika A. Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients: Species and antifungal susceptibility in Tripoli/Libya. *Int J Clin Microbiol Biochem Technol.* 2018;1(1):001-8. <https://doi.org/10.29328/journal.ijcmbt.1001001>
20. Castro LÁ, Álvarez MI, Martínez E. *Candida* in the oral cavity of HIV-infected patients: Identification of species and susceptibility to fluconazole in Cali, Colombia. *Iatreia.* 2015;28(4):368-377. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a02>
21. Camacho L D, Mata E S, Pardi G, Pineda V, Roselló A, Collela MT. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. *Kasmera.* 2012;40(1):47-58. [URL](#).
22. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Ten years on. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253(1):9-17. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.015>
23. Tantivitayakul P, Panpradit N, Maudcheingka T, Klaophimai A, Lapirottanakul J. Genotyping of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S rDNA analysis shows association with virulence attributes in oral candidiasis. *Arch Oral Biol.* 2019;97:18-24. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.006>
24. Albaina O, Sahand IH, Brusca MI, Sullivan DJ, Fernandez de Larrinoa I, Moragues MD. Identification and characterization of nine atypical *Candida dubliniensis* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 2015;64(Pt_2):147-56. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.078832-0>
25. Lockhart SR. Do Hospital Microbiology Laboratories Still Need To Distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*? *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4415. <https://doi.org/10.1128/JCM.05923-11>
26. EUCAST. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 4.0, 2023. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2023. Disponible en: <http://www.eucast.org>
27. Zuluaga Rodríguez A, de Bedout Gómez C, Agudelo Restrepo CA, Hurtado Parra H, Arango Arteaga M, Restrepo Moreno Á, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de

- unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). *Rev. iberoamer. micol.* 2010;27(3):125-9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.04.001>
28. Aguilar G, Araujo P, Lird G, Insaurralde S, Kawabata A, Ayala E, et al. Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida* spp. aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay. *Rev Panam Salud Publica.* 2020;44:e34. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.34>
29. Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A. Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(2):107-110. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70057-4](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70057-4)
30. Quiles-Melero I, García-Rodríguez J. Antifúngicos de uso sistémico. *Rev Iberoam Micol.* 2021;38(2):42-6. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.004>
31. Pineda-Murillo J, Cortés-Figueroa AA, Uribarren-Berrueta T del NJ, Castañón-Olivares LR. Candidosis vaginal: Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Rev Méd Risaralda.* 2017;23(1):38-44. [URL.](https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.004)
32. Alburquenque C, Beltrán S, Olivares R, Falconer MA, Amaro J, Fuentes M, et al. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Rev Chil Infectol.* 2013;30(3):244-51. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000300002>
33. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br. J. Haematol.* 2014;166(4):471-484. <https://doi.org/10.1111/bjh.12896>