



**Universidad
Norbert Wiener**

UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO

CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

**“DIFERENCIACIÓN DE *Candida albicans* DE *Candida dubliniensis* EN AGAR
TABACO, PREPARADO CON EL TABACO DE TRES MARCAS DE CIGARROS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADOS EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMIA
PATOLÓGICA

Presentado por:

BACHILLERES: ABANTO CASTILLO, JOHAN ALEXANDER

VALVERDE TICLIA, FANNY NOEMÍ

ASESOR: Mg. ROJAS LEON, ROBERTO EUGENIO

LIMA PERU

2018

Asesor de tesis

Licenciado Tecnólogo Médico en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Mg. ROBERTO EUGENIO ROJAS LEÓN

Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud del Niño- Breña.

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Benites Azabache, Juan Carlos

SECRETARIO: Mg. Sandoval Vegas, Miguel Hernán

VOCAL: Mg. Quispe Manco, María Del Carmen

Agradezco a:

Al Lic. TM Roberto Eugenio Rojas León por la asesoría metodológica en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Al Lic. TM Javier Soto Pastrana del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé; al Lic. TM Mauro Wilber Duran Ocaña y a la Blgo. Flor Ursia Ausejo del Instituto Nacional de Salud, a la Lic. TM Luz Castillo Caro, Lic. TM Gina Rosas Elescano por su apoyo brindado al desarrollo de nuestro proyecto.

ÍNDICE

1. EL PROBLEMA	13
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14.
1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA	16
1.3. JUSTIFICACION	16
1.4. OBJETIVOS	17
1.4.1 GENERAL	17
1.4.2 ESPECÍFICOS	17
2. MARCO TEORICO	18
2.1. ANTECEDENTES	19
2.2. BASE TEORICA	21
2.3. TERMINOLOGIA BASICA	38
2.4. HIPOTESIS	40
2.5. VARIABLES E INDICADORES	40
2.6. DEFINICION OPERACIONAL DE TERMINOS	41
3. DISEÑO Y METODOS	42
3.1 TIPO DE INVESTIGACION	43
3.2 AMBITO DE INVESTIGACION	43
3.3 POBLACION Y MUESTRA	43

3.4 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS	43
3.5 PLANES DE PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS	44
3.6 ASPECTOS ETICOS	46
4. RESULTADOS Y DISCUCIONES	47
4.1 RESULTADOS	48
4.2 DISCUSIÓN	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
5.1 CONCLUSIONES	55
5.2 RECOMENDACIONES	56
6. REFERENCIAS	57
7. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Clasificación taxonómica de <i>Candida dubliniensis</i> .	30
Tabla N°2: Características morfológicas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> en el agar tabaco, preparado con el tabaco del cigarro Hamilton.	47
Tabla N°3: Características morfológicas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> en el agar tabaco, preparado con el tabaco del cigarro Premier.	48
Tabla N°4: Características morfológicas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> en el agar tabaco, preparado con el tabaco del cigarro Pallmall.	49
Tabla N°5: Comparación de las características de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> en el agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarros (Hamilton, Premier y Pallmall).	50

ÍNDICE DE IMAGENES

	Pág.
Figura N°1: Formas de crecimiento de <i>Candida</i> : levadura (A), hifas (B) y pseudohifas (C), micelios (D).	23
Figura N° 2: Etapas de la infección por <i>Candida albicans</i> y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa.	25
Figura N° 3: Mecanismo de virulencia.	26
Figura N° 4: Enzimas Degradativas de <i>Candida albicans</i> .	27
Figura N° 5: Morfología de <i>Candida dubliniensis</i> . (A) Hifas; (B) pseudohifas teñidas con calcoflúor (C), levaduras y (D) clamidosporas teñidas con azul de lactofenol.	31
Figura N° 6: Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining a partir del alineamiento de las secuencias de genes de las subunidades pequeñas de rRNA de <i>Candida dubliniensis</i> .	32

Figura N° 7: Color de las colonias en medio CHROMagar a 37°C durante 48 horas. 36

Figura N° 8: Cepas aisladas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar Sabouraud, aislamiento primario. 64

Figura N° 9: Sembrado de las cepas en los respectivos medios de agar preparados con el tabaco de los cigarrillos (Hamilton, Premier y Pallmall). 64

Figura N° 10: Crecimiento de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarrillo Hamilton. 65

Figura N° 11: Crecimiento de *candida albicans* y *candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarrillo Premier. 66

Figura N° 12: Crecimiento de *candida albicans* y *candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarrillo Pallmall. 66

Figura N° 13: *Candida dubliniensis*: presencia de festones a las 72 horas. 67

- Figura N° 14:** *Candida dubliniensis*: ausencia de festones a las 72 horas. 67
- Figura N° 15:** Levaduras de *Candida albicans* a las 72 horas de incubación ausencia de festones. 68
- Figura N° 16:** Levaduras de *Candida dubliniensis* a las 72 horas de incubación presencia de festones. 68
- Figura N° 17:** Levaduras de *Candida albicans* a las 72 horas de incubación ausencia de festones. 69
- Figura N° 18:** Levaduras de *Candida dubliniensis* a las 72 horas de incubación presencia de abundantes festones. 69
- Figura N° 19:** Microcultivos para observar las clamidosporas de *Candida dubliniensis*. 70
- Figura N° 20** Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Pallmall. 71
- Figura N° 21** Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Hamilton. 71
- Figura N° 22** Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Premier. 72

Resumen:

Las infecciones por levaduras del género *Candida*, son cada vez más frecuentes, particularmente cuando se presentan condiciones que inmunosuprimen al paciente, como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otros. El objetivo fue describir la diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* en agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarros.

Metodología: Se realizó la investigación de tipo observacional, transversal, descriptivo, a partir de dos cepas del Género *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, aisladas y confirmadas por el Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño - Breña, las cuales fueron sembradas posteriormente en el agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarros (Hamilton, Premier y Pallmall) e incubadas a 96 horas a 28C°, en el servicio de microbiología del hospital de Huaycan.

Resultados: Se pudo observar las diferencias macroscópicas y microscópicas entre *candida albicans* y *candida dubliniensis* a las 72 horas de haber sido incubadas cumpliendo los objetivos esperados en la investigación.

Conclusiones: El estudio permitió describir las diferencias específicas entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, a través del agar tabaco, preparado con el tabaco de los cigarros (Hamilton, Premier y Pallmall), nos da una buena especificidad aproximadamente de un 100% como lo describen algunos autores.

Palabras claves: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, agar tabaco.

Summary:

Yeast infections of the genus *Candida* are currently becoming more frequent, particularly when there are conditions that immunosuppress the patients, such as Acquired Immune Deficiency Syndrome (SIDA), among others. The objective was to describe the differentiation of *Candida albicans* from *Candida dubliniensis* on tobacco agar, prepared with tobacco from three brands of cigars.

Methodology: Observational, cross-sectional, descriptive research was carried out from two strains of the *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated genotypes and confirmed by the Microbiology Service of the National Institute of Child Health - Breña, which were later seeded in agar Tobacco prepared with tobacco from three brands of cigars (Hamilton, Premier and Pallmall) and incubated at 96 hours at 28C °, in the microbiology service of Huaycan Hospital.

Results: The macroscopic and microscopic differences between *candida albicans* and *candida dubliniensis* were observed 72 hours after being incubated, fulfilling the objectives expected in the investigation.

Conclusions: The study allowed to describe the specific differences between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, through tobacco agar, prepared with the tobacco of the cigars (Hamilton, Premier and Pallmall), gives us a good specificity of approximately 100% as described by some authors.

Key words: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, tobacco agar.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas las infecciones producidas por hongos alcanzan una importante amenaza para la salud de la población, sobre todo en pacientes con compromiso inmune, las enfermedades causadas por estas levaduras incluyen infecciones superficiales y sistémicas que afectan a diferentes órganos, que se asocian con altos niveles de morbilidad (1-3,10,11,14,26)

La gran mayoría de infecciones fúngicas son producidas por *Candida albicans*, sin embargo, cabe destacar otras especies patógenas oportunistas comunes como *Candida dubliniensis*, etc. (2 – 6,9,12,14,15)

En 1995, se descubrió una nueva especie de *Candida*, que fue identificada como *Candida dubliniensis*, el nombre de esta especie fue propuesta por Sullivan y cols., en Dublín (Irlanda), este microorganismo fue inicialmente aislado de la cavidad oral de pacientes infectados por VIH, en la década de 1990. (7,8,13,25,26,28)

Desde el primer caso descubierto de *Candida dubliniensis* se ha identificado en muchas regiones a nivel mundial como Irlanda, Turquía, Bélgica, Francia, Usa, Canadá, Venezuela, Brasil, etc.

A pesar que *Candida dubliniensis* se aisló inicialmente de la cavidad oral, hay estudios que demuestran su aislamiento de otras partes del cuerpo como tracto respiratorio, sangre, vagina, orina, etc., tanto en pacientes adultos y pediátricos VIH positivos como pacientes VIH negativos. (4,17,27,28)

Candida Dubliniensis ha llamado la atención de los investigadores por presentar características fenotípicas y genotípicas muy similares a *Candida albicans*.

Candida dubliniensis a diferencia de *Candida albicans* hace resistencia al fluconazol, y este es el tratamiento de elección en la infección por *Candida spp*, también presenta una mayor capacidad de adherencia a las células de la mucosa oral. (6,7,10-13,16,20)

Las similitudes entre estas dos especies dificultan su pronta diferenciación y pueden conducir a resultados erróneos ya que comparten características morfológicas y bioquímicas similares. Ambas levaduras tienen la capacidad de formar tubos germinativos y Clamidoconidios. Además de presentar un color similar en algunos medios cromogénicos, las pruebas precisas para diferenciar estas dos especies son las técnicas moleculares, sin embargo, estas son sofisticadas, costosas y laboriosas (10,11-14,22,23,).

Existen diferentes métodos fenotípicos en la actualidad para diferenciar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* tales como el Agar Sabouraud dextrosa a 45°C, Agar Sabouraud Hipersalado NaCl al 65%, ausencia de actividad lipólica en el agar tween 80, capacidad de formar clamidoconidias en el agar tabaco, agar pal's, etc. (7,16,20,21,24)

Por lo antes expuesto, el objetivo del estudio fue describir la diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* en agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos locales para comparar las características morfológicas de estas dos levaduras, ya que pasan desapercibida en la mayoría de casos por falta de una correcta identificación, la preparación de este medio es sencilla, de bajo costo, comparado a otros medios comerciales disponibles en los laboratorios de nuestro país.

(15,16,20,21,24,29,30)

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Se podrá evaluar las características morfológicas en el agar tabaco preparado con tres marcas de cigarrillos, para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*?

1.3. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes métodos fenotípicos y genotípicos para aislar estas dos especies, algunos con poca factibilidad de realizarse como pruebas de rutina por su complejidad y costos elevados, ante ello, es imprescindible evaluar nuevos medios sencillos y económicos para lograr la diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Debido a su gran similitud filogénicamente, se dificulta la adecuada identificación, resaltando que *Candida dubliniensis* tiene la capacidad de generar rápidamente

resistencia al fluconazol, originando así las fallas en los tratamientos usados para las infecciones causadas por las diversas especies existentes, por lo que proponemos el uso del agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos, siendo este medio sencillo, económico, reproducible y así establecer una significancia clínica y epidemiológica de estas dos especies de patógenos oportunistas que no están aislándose correctamente.

1.4. OBJETIVO

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Describir la diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* en agar tabaco, preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*.
- Indicar el tiempo de crecimiento para la evaluación del agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos, para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*.

CAPÍTULO II: MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES

Según los hallazgos internacionales revisados se encontró las siguientes investigaciones relacionadas con el tema.

- Harrison O *et al.* (2017), realizaron un estudio denominado “Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients”. El objetivo de este estudio fue evaluar las levaduras aisladas de la mucosa oral de pacientes pediátricos con SIDA que inicialmente se caracterizaron como *Candida albicans* por el método fenotípico tradicional. Para diferenciar las dos especies, se realizaron pruebas fenotípicas (pruebas de termotolerancia, medios cromogénicos, agar Staib, agar de tabaco, medio hipertónico que son indispensables para la identificación de estas dos especies. ⁽⁴⁾

- Camacho L *et al.* (2012), evaluaron diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. El objetivo de esta investigación fue evaluar diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Los métodos evaluados fueron: agar Sabouraud dextrosa a 45°C, agar Sabouraud con NaCl al 6,5%, agar Tween 80, agar tabaco, agar Pal's, agar tomate-zanahoria y aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze®). En este estudio se determinó las técnicas más confiables para realizar la

diferenciación fenotípica entre estas dos especies a través de agar tomate-zanahoria, el agar Pal's, el agar tabaco. ⁽¹⁶⁾

- Muñoz (2012), realizó en Chile, el trabajo que tuvo como objetivo caracterizar molecularmente cepas de *Candida dubliniensis* aisladas de muestras clínicas, para el desarrollo de este trabajo usaron 261 cepas y emplearon para su identificación técnicas fenotípicas y genotípicas, concluyendo que el total de sus cepas analizadas corresponden a *Candida albicans*. ⁽¹²⁾

- Bartoli M *et al.* (2011), realizaron un estudio denominado “Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* Y *Candida albicans* propuesta de una secuencia de identificación”, el objetivo del estudio fue usar diferentes métodos fenotípicos para diferenciar ambas especies con la finalidad de determinar quién tiene mejor relación costo especificidad, enfatizando la capacidad de formación de clamidoconidias, a través de diferentes medios de cultivos (agar tabaco , agar harina de maíz ,etc.). Se concluye que el medio agar tabaco con tween 80 puede ser utilizado como medio de aislamiento primario. ⁽²⁰⁾

- Zia U *et al.* (2004), con la investigación “Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*”, para la preparación del agar de tabaco, se utilizó el método descrito por Tendolkar *et al*, que usa el tabaco procesado en lugar de hojas de

tabaco, usaron 30 aislamientos de *Candida dubliniensis* produciendo colonias rugosas de color marrón, formando abundantes clamidosporas en las franjas de hifas periféricas después de 24 a 48 h de incubación a 28 °C. En este medio, los aislamientos de *Candida albicans* muestran colonias de color blanco a crema sin franjas de hifas o clamidosporas. Se concluye sobre las características fenotípicas que desarrollaron fueron bien diferenciadas por su color y la producción abundante de clamidosporas, siendo este agar tabaco, un medio simple para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. con una alta precisión. ⁽³⁰⁾

2.2. BASES TEÓRICAS:

Los hongos del género *Candida* fueron descritos por primera vez por Christine Marie Berkhout en 1923. La clasificación actual engloba al género *Candida* dentro del reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Ascomycotina, clase Ascomycetes, orden Saccharomycetales y familia Saccharomycetaceae.

El género *Candida* comprende más de 200 especies de levaduras que difieren por su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la composición de los polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías. Solamente un pequeño número de estas especies son patógenas para los humanos, de hecho, el 65% de ellas son incapaces de crecer a 37 °C, primer requisito necesario para el éxito de cualquier organismo patógeno ^(2,8,12,23).

Las especies del género *Candida* forman parte de la microbiota normal en aproximadamente el 50% de las personas, aunque los datos pueden variar dependiendo de la población estudiada. *Candida* es un comensal habitual en la cavidad oral, en el aparato digestivo y en la vagina. La especie que se aísla con mayor frecuencia es el género de *Candida albicans*, constituyendo un 60-80% de los aislamientos en la cavidad oral y un 80-90% de las secreciones vaginales, otros lugares anatómicos donde también se aísla *Candida albicans* son las regiones húmedas o dañadas de la piel y las uñas. (5,6,15,23,24,27)

2.2.1. *Candida albicans*:

Es un patógeno fúngico en los humanos, por su importancia clínica y como un modelo experimental para la investigación científica, conocida por ser un hongo oportunista en el entorno de cualquier organismo vivo, es un modulador de pH en el biofilms y uno de sus hábitats es la cavidad oral de los seres humanos. (5,11,14)

Candida albicans coloniza de manera asintomática diversas partes del cuerpo, específicamente los tractos gastrointestinal y genitourinario de personas sanas sin embargo, en individuos inmunocomprometidos es un posible patógeno oportunista, es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, es un microorganismo aerobio que se reproduce asexualmente por gemación; la transición de levadura a hifa es importante

para desarrollar su patogenicidad, las hifas se reproducen al invadir los tejidos, existen numerosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean su conversión; por ejemplo, en un pH bajo inferior a 6 este microorganismo crece en la forma de levadura, mientras que en un pH alto superior a 7 crece en forma de hifa. (11,12,14)

Candida albicans es una levadura ovalada o esférica de $3 - 8 \times 2 - 7 \mu\text{m}$ que forma pseudohifas, eventualmente hifas verdaderas, presenta clamidosporas terminales en las hifas, cuando son incubadas en sueros humanos de dos a tres horas a 37°C para observarse los tubos germinativos, las colonias tienen un color crema de consistencia húmeda, la mayoría de los aislados de *candida albicans* permanecen muy sensibles a la gran mayoría de los antifúngicos sistémicos utilizados en la clínica.

Candida albicans es un hongo polimórfico porque se puede presentar como levadura o crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas.

- **Levadura:** son células redondeadas producidas por gemación, se encuentran físicamente separadas de la célula madre después de citocinesis. Durante la gemación se forma un cuello entre célula madre y célula hija a través del cual se lleva a cabo la división nuclear.
- **Pseudomicelio:** se produce de una levadura o hifa por gemación, la célula hija permanece unida a la célula madre, se alarga en

cadena de células que muestran varios grados de elongación y pueden tener la forma de un rosario o la apariencia de un filamento.

- **hifas verdaderas:** se forman a partir de una levadura o como ramificaciones de una hifa ya formada. ⁽¹³⁾

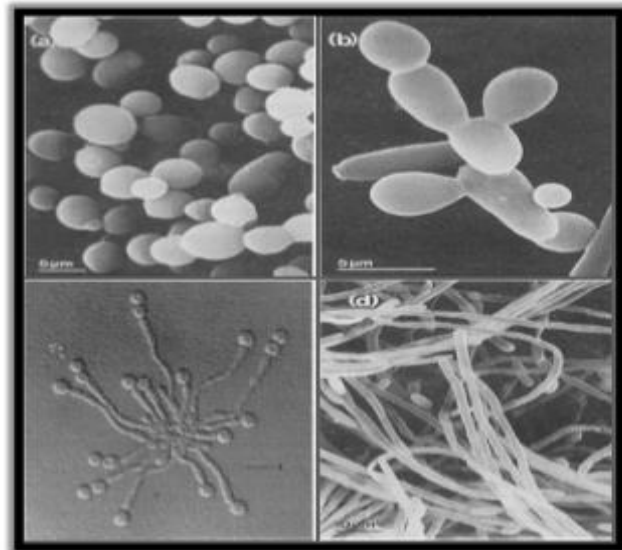


Fig. 1. Formas de crecimiento de *Candida albicans*: levadura(A), hifas (B) y pseudohifas (C), micelios (D) ⁽¹³⁾

2.2.1.1. Factores de virulencia:

Los factores de virulencia de este patógeno oportunista incluyen su habilidad para sobrevivir como comensal, desarrollando factores efectivos para colonizar los tejidos del huésped, estos varían dependiendo del tipo de candida, sitio, estado de la infección y la naturaleza de la respuesta del huésped ^(9,15).

Estos factores de virulencia juegan un papel importante en cada etapa de infección de *Candida albicans*, dividiéndose en cuatro etapas:

1. Colonización: participa la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio de fenotipo.

2. Infección superficial: en esta etapa es importante la **penetración epitelial** por medio de degradación de proteínas del hospedero, enzimas hidrolíticas y formación de hifas.

3. Infección profunda: participan la **penetración tisular**, invasión vascular y evasión inmune por medio de enzimas hidrolíticas y también la formación de hifas.

4. Infección diseminada: se realiza a través de la adherencia al endotelio, infección de tejidos del hospedero, activación del sistema de coagulación, enzimas hidrolíticas, formación de hifas

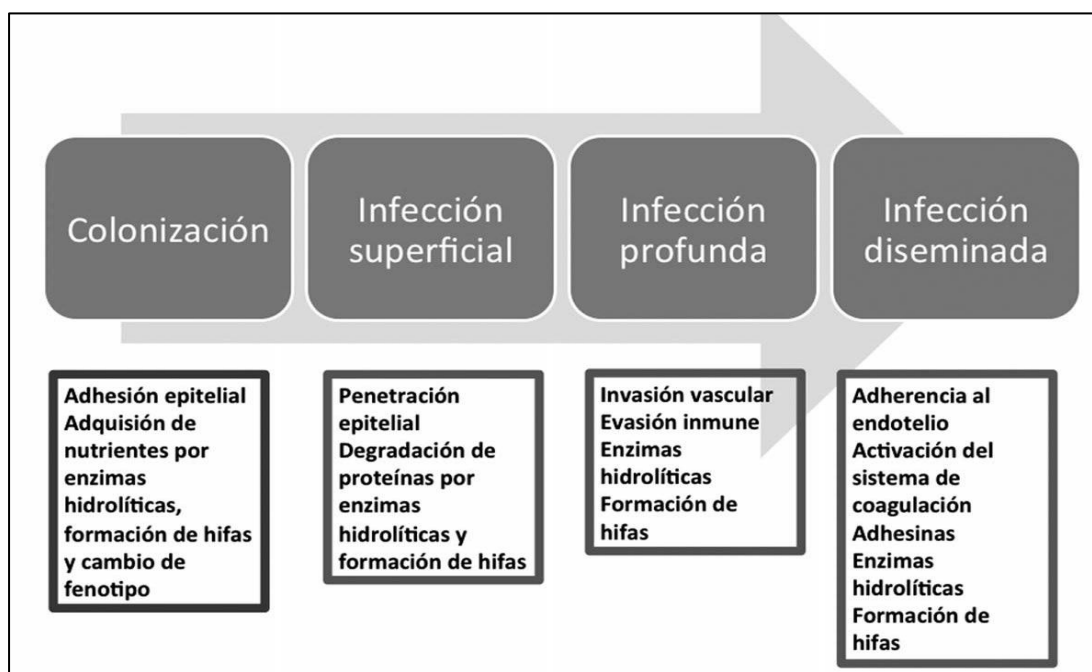


Fig. 2: Etapas de la infección por *Candida albicans* y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa. ⁽¹⁵⁾

Otras de las características de *candida albicans* que se relacionan con su capacidad de patogenicidad son: ⁽¹³⁾

A. **capacidad de adherencia:** están implicados mecanismos de diferentes naturalezas, debida en gran manera a numerosas manoproteínas de las células fúngicas, la quitina y adhesinas tipo fimbrias, unos establecen uniones de carácter físico químico que acercan al patógeno a la superficie del hospedero, por ejemplo, la hidrofobisidad (presencia de la proteína Csh1p) y otro que implican la presencia de adhesinas y receptores en el sustrato favoreciendo la formación de biopelículas.

B. **Dimorfismo:** proceso por la cual las levaduras experimentan un cambio de estructuras que afecta la célula convirtiéndolo en filamento miceliar. La formación de este micelio se relaciona con la virulencia debido a tres observaciones:

- La filamentación se induce a 37°C en presencia de suero y pH neutro.
- Se ha comprobado que los filamentos son más adherentes a las células de mamíferos que las levaduras.
- Las levaduras fagocitadas por filamentos producen la lisis de dichos macrófagos.

C. **Variabilidad genética:** en *Candida albicans* se ha descrito un elevado grado de recombinación mitótica y un gran número de reorganizaciones macrosómicas; estos mecanismos generarían variabilidad genética en ausencia del ciclo meiótico en esta levadura.

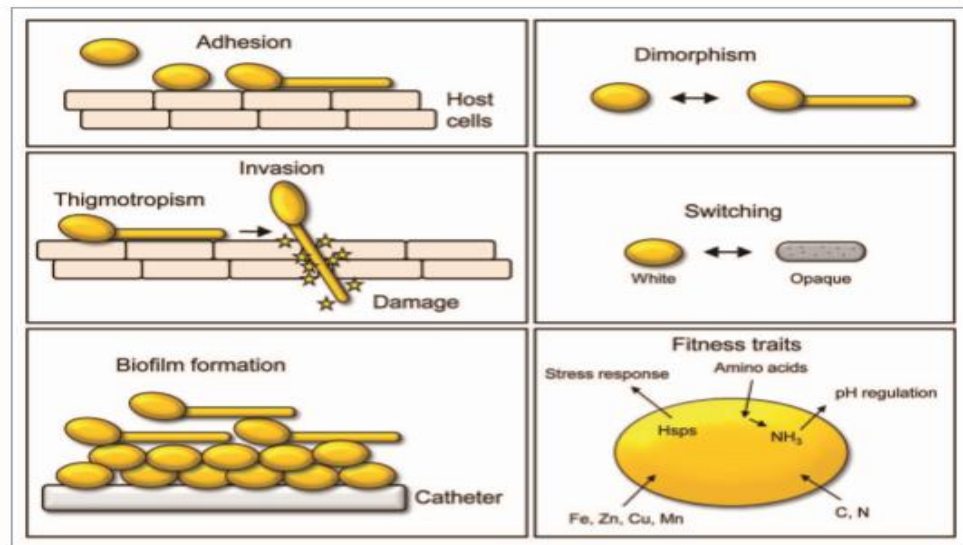


Fig. 3: Mecanismo de virulencia ⁽⁹⁾

D. **Variabilidad antigénica:** este mecanismo permite a la levadura escapar del sistema inmunitario del huésped, siendo capaz de llevar a cabo la transformación morfológica.

E. **Hidrofobisidad:** permite una mejor adhesión a las superficies de las células que ataca.

F. **Enzimas degradativas secretadas:** son dos grandes familias de enzimas degradativas secretadas y algunas han sido invasivas:

- Las Aspartil Proteinases (SAP) codificadas por diez genes

- Las Fosfolipasas (PL)

Las SAPS 1, 2 y 3 son secretadas solo por levaduras causando daño tisular e invasión del epitelio oral y la epidermis, las SAPS 4, 5 y 6 producidas por las hifas causan infección sistémica, y las SAPS 9 y 10 están conectadas con la pared celular fúngicas al poseer un sitio de unión de la superficie celular ligados a las glicocilfosfatidilinositol (GP1).



Fig. 4: Enzimas degradativas de *Candida albicans*.⁽¹⁵⁾

G. Biopelículas: es una estructura de levaduras en hifas producidas por sí mismas, que contribuyen en la dificultad en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas debido a su alta resistencia a la respuesta inmune a los medicamentos antifúngicos que le sirven al hongo como una superficie de adhesión, está regulada por el factor de transcripción Bcr1p, la adhesina Hwp1, una de las adhesinas específicas de la producción de hifas.

Para su formación es necesario que las levaduras se unan a la superficie de látex, silicona o plástico por medio de las adhesinas.

2.2.2. *Candida dubliniensis*

Es una levadura identificada como agente oportunista implicada como causa de candidiasis oral en pacientes VIH positivos y SIDA, adquirió jerarquía al descubrirse su resistencia a los tratamientos con los antifúngicos, *candida dubliniensis* no es bien conocida ya que pasa desapercibida en la mayoría de los casos por falta de una correcta identificación.

Candida dubliniensis es un hongo descrito en Dublín, Irlanda, en el año 1995 por J Sullivan, desde inicio de la década de los 90, mientras se realizaba una investigación epidemiológica de la candidiasis oral en pacientes con VIH, observando que ciertos aislamientos inicialmente identificados como *candida albicans* por la producción de tubos germinales y clamidoconidias, pero no hibridaban de manera eficiente la sonda de ADN 27^a específica para *candida albicans*.

En las últimas dos décadas la biología molecular ha tenido una importante aplicación para el desarrollo de la taxonomía fúngica.

Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión	<i>Saccharomycotina</i>
Clase	<i>Saccharomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>C. dubliniensis</i>

Tabla1. Clasificación taxonómica de *candida dubliniensis*

A. MORFOLOGIA

Las colonias de *candida dubliniensis* son de color blanco a crema, redondas y crecen mejor a temperaturas no mayores de 37°C, hasta la fecha no se conoce la forma de reproducción sexuada.

Puede presentar cuatro tipos morfológicos diferentes en función de las condiciones ambientales: levaduras o blastosporas, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidosporas. ^(9, 17)

- **Levaduras:** Son células de forma esférica u ovoide de 3 a 7 μm de diámetro, se multiplican por gemación; su crecimiento se ve favorecido en condiciones de aerobiosis, temperaturas inferiores a 33 °C y dentro de un rango de pH de 2,5 - 7,5.
- **Pseudohifas:** Están formadas por cadenas de blastosporas alargadas que simulan filamentos verdaderos.
- **Hifas:** Tienen formas alargadas y están formadas por varias unidades celulares más o menos cilíndricas separadas por septos.
- **Clamidosporas o clamidoconidios:** Son células grandes, redondeadas, con pared engrosada y baja actividad metabólica, que se producen en el micelio de forma intercalar o terminal. Estas formas de resistencia, pueden dar lugar a nuevas levaduras o bien degenerar.

Las clamidosporas se caracterizan por tener una capa externa compuesta principalmente por **β -1,3 glucano** y en menor proporción quitina, una gruesa capa interna compuesta por proteínas y una región central de la célula rica en ácido ribonucleico y glóbulos lipídicos: ^(9, 17)

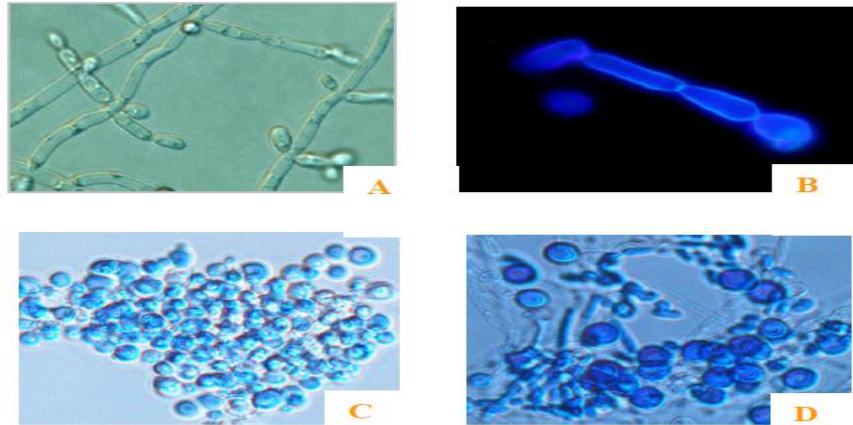


Fig. 5. Morfología de *C. dubliniensis*. (A) Hifas; (B) pseudohifas teñidas con calcofluor; (C) levaduras y (D) clamidosporas teñidas con azul de lactofenol. ⁽⁹⁾

La ausencia de expresión de β -glucosidasa y la incapacidad para crecer a 42 °C a diferencia de *Candida albicans*. Dentro de sus características genóticas es diploide al igual que *Candida albicans*; sin embargo, ambas especies presentan diferentes patrones al utilizar RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis Analysis), hibridación con DNA microsátélites, y secuencias de genes rDNA. ^(9, 17)

B. Filogenia de *Candida dubliniensis*

Se realizaron estudios posteriormente que demostraron una menor patogenicidad comparada a *Candida albicans*.

Estudios filogenéticos basados en el análisis de las secuencias del gen de las subunidades pequeñas del rRNA demostraron que *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* están cercanamente emparentadas, se puede observar que comparten un 99.5% de nucleótidos en este gen. (9,17)

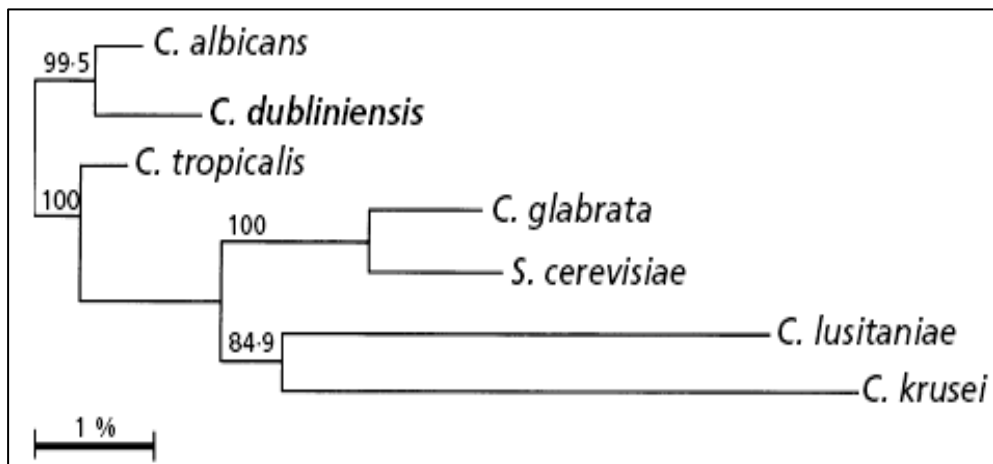


Fig. N° 6. Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining a partir del alineamiento de las secuencias de genes de las subunidades pequeñas de rRNA de *Candida dubliniensis*. (17)

El parentesco cercano entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* coincide con sus aparentes similitudes fenotípicas, en la mayoría de casos, la homología de los genes que se han comparado entre las dos especies es de aproximadamente 90% de identidad al nivel de nucleótidos, con algunos genes altamente conservados como ACT1 el cual muestra 98% de identidad. La disposición del genoma completo de *Candida albicans* y

la secuenciación del genoma casi terminado de *Candida dubliniensis*, permitió identificar los genes que pueden estar ausentes o ser divergentes en *Candida dubliniensis*.

C. GENOMA:

Candida dubliniensis fue secuenciado en el año 2009, está compuesto por ocho pares de cromosomas y se estima que su tamaño completo es de 14,6 Mb.

D. FACTORES DE VIRULENCIA:

Presenta casi los mismos factores de virulencia que *Candida albicans*, resaltamos algunos aspectos específicos para *Candida dubliniensis*, presenta ocho genes SAP, presenta una elevada actividad proteolítica y adherencia a las células epiteliales bucales.

Conserva sólo uno de las proteasas relacionadas con la formación de hifas (CdSAP4).

Candida dubliniensis mantiene la capacidad de Hidrofobisidad independientemente de la temperatura en comparación con *candida albicans*, este comportamiento tiene relación con la presencia de un tipo de N-glucanos, se presentan en menor cantidad estas células hidrófobas no son resistentes a las fagocitosis.

2.2.3. METODOS PARA LA DIFERENCIACION DE *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

Candida dubliniensis presenta características fenotípicas casi idénticas a las de *Candida albicans* que hace difícil su identificación; pero, se han desarrollado diversos métodos basados en sus características fenotípicas, genotípicas e inmunológicas con la finalidad de ser diferenciadas con mayor facilidad.

Algunos métodos fenotípicos se basan en cultivos diferenciales, mediante ellos, se analiza el color de las colonias que se desarrollan en dichos medios (medios cromogénico), para analizar sus características fisiológicas se realiza la prueba del tubo germinal o la de termotolerancia, para la evaluación de características morfológicas macro-microscópicas, la formación de clamidosporas en las pruebas bioquímicas (asimilación de fuentes de carbono), en métodos inmunológicos las pruebas de aglutinación con partículas de latex (Bichro-Dubi Fumouze) y en cuanto a los métodos moleculares existen diversas técnicas como la PCR, hibridación con sondas o RAPD^(4,7,13,16,20,21,24)

a) MEDIOS CROMOGÉNICOS

Fue introducida por Nickerson en 1953, a través de la reducción del sulfito de bismuto y la morfología presentada en el medio BIGGY diferenciaba colonias de color beige o marrón a negras según la especie de *Candida*.

Posteriormente, en 1958, Pagano y cols., adicionaron al medio de agar Sabouraud dextrosa, un compuesto químico, el cloruro de trifenil-tetrazolio, cuya reducción por el hongo tiñe las colonias en varias tonalidades que permite diferenciar *Candida albicans* de otras especies de *Candida*.

En los últimos años, se ha promovido el uso de medios cromogénicos, se obtiene la identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*, por ejemplo; el uso CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Company, Francia), ChromID *Candida*® (bioMérieux, Francia) o Candiselect 4® (Bio-Rad, Francia). Este medio facilita el reconocimiento de cultivos mixtos de levaduras, de modo que la hidrólisis enzimática del agente cromogénico permite la identificación específica de las colonias de *Candida albicans* por su color verde, las colonias de *Candida dubliniensis* por su color verde oscuro.

Este medio resulta muy útil para identificar colonias de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en cultivos primarios de muestras clínicas después de 48 horas de incubación. ⁽¹³⁾

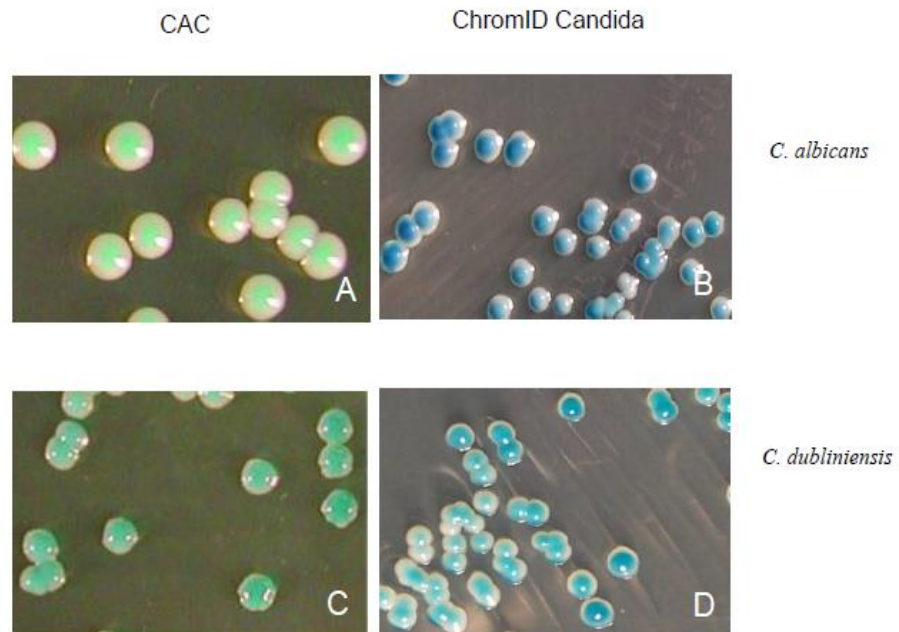


Fig. 7. Color de las colonias en medio CHROMagar a 37°C durante 48 horas.

b) Producción de clamidosporas:

Se han desarrollado diferentes medios que contienen extractos de plantas o semillas que permiten la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis*, mientras que en *C. albicans* no se forman clamidosporas, observándose colonias lisas. Por ejemplo, el agar Pal, es elaborado con semillas de girasol (*Helianthus annuus*) permite aislar y diferenciar los aislamientos de clínicos de *candida albicans* y *candida dubliniensis* en base al color y al aspecto de sus colonias. También tenemos el agar Staib elaborado con extractos de semillas de negrillo (*Guizotia abyssinica*), en un inicio se usó para diferenciar *Criptococcus neoformans* de otras levaduras. Es también válido para diferenciar

Candida dubliniensis de *Candida albicans*, ya que induce la producción de clamidosporas en *candida dubliniensis*, así también se usa el agar tabaco.

c) CRECIMIENTO A DISTINTAS TEMPERATURAS:

Candida dubliniensis y *Candida albicans* crecen adecuadamente a 30°C y 37°C produciendo unas colonias blancas cremosas en los medios sólidos, también tiene la capacidad de crecer tanto a 42°C a 45°C después de 48 horas de incubación. *Candida dubliniensis* crece con dificultad a 42°C y no crece a 45°C, por lo que es válido como método de discriminación de *candida albicans* de *candida dubliniensis*.

2.3. TERMINOLOGIA BASICA

2.3.1. Tabaco:

Es un producto obtenido de las hojas de *Nicotiana tabacum*.

2.3.2. Agar tabaco modificado:

Se refiere a la modificación del agar inicialmente preparado con hojas de tabaco y modificado posteriormente por el uso del tabaco de los cigarros.

2.3.3. *Candida albicans*:

Levadura diploide asexual, saprófito de la familia de los sacaromicetos, aislada con mayor frecuencia por ser la más patógena.

2.3.4. *Candida dubliniensis*:

Levadura dimórfica, con características filogenéticas semejantes a *Candida albicans*, aislada originalmente en pacientes con VIH con lesiones orofaríngea.

2.3.5. Características morfológicas:

Son las formas que se describe a las levaduras desarrolladas en los diferentes medios.

Las características morfológicas pueden ser: aspecto, color, tamaño y textura que presentan las colonias en un medio de cultivo.

2.3.6. Velocidad de crecimiento: se refiere al crecimiento demográfico de una colonia.

La velocidad de crecimiento depende de las condiciones nutricionales y ambientales.

2.3.7. Clamidosporas:

Es un tipo de espora de paredes gruesas dependiendo de las diferentes clases de hongos. Es una etapa del ciclo vital del

organismo que sobrevive en condiciones desfavorables, tales como estaciones secas o cálidas o déficit nutricional.

2.3.8. Diferenciación: Capacidad de ser diferente o identificable de otras especies. Permite en las pruebas ensayadas discriminar características específicas de las colonias.

2.4. HIPOTESIS

En esta investigación no se plantea hipótesis porque el trabajo es cualitativo, además, es observacional cualitativo no cuantitativo.

2.5. VARIABLES E INDICADORES

Variable de tipo

- Por su naturaleza es: categórica politómica
- Por su escala de medición es: ordinal.

2.6: CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Ttipo de variable	Dimención	Indicador	Escala de medición	Valores
Agar tabaco (variable dependiente)	Caulitativa	-----	*Crecimiento de cepas *Contaminacion	-----	Alta
<i>Candida albicans</i> y <i>candida dubliniensis</i> (variable independiente)	Ordinal	-----	Cepas identificadas	Ordinal	Presencia o Ausencia
Tiempo de crecimiento (variable interviniente)	Cuantitativo	-----	Horas	Discreta	72 horas

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio de investigación es de tipo observacional, transversal y descriptivo.

3.2. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

Para el desarrollo del trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del servicio de microbiología de los hospitales: Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé y el Hospital Huaycan – Ate, por el espacio de 15 días que durará la parte procedimental.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1. POBLACIÓN:

Cepas del genero *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

3.3.2 muestra:

Tres cepas del género *Candida albicans* y tres del género *Candida dubliniensis* que fueron aisladas y confirmadas en el servicio de microbiología del instituto Nacional de Salud del Niño- Breña.

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Por el tipo de trabajo no se usó ningún programa estadístico, pero se elaboró cuadros en el programa Excel para detallar las características observadas.

3.5. PROCESAMIENTO DE DATOS

Se recibieron tres cepas de *Candida albicans* y tres cepas de *Candida dubliniensis*, aisladas y confirmadas de la micoteca del servicio de microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño – Breña.

En un inicio el trabajo fue desarrollado en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé, donde se aplicó el mismo procedimiento en el agar tabaco para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*, pasado las 96 horas, no se pudo ver ninguna diferencia, por lo que nos llevó a repetir nuevamente el protocolo de trabajo. Este segundo proceso se realizó en el laboratorio del servicio de microbiología del Hospital Huaycan- Ate.

Iniciamos el procedimiento del trabajo reactivando estas cepas en el medio de agar Sabouraud Dextrosa durante 24 horas para su desarrollo respectivo. Posteriormente, cogimos una asada de cada una de las cepas en estudio para ser sembradas en las placas preparadas de agar tabaco con las marcas de cigarrillos Hamilton, Premier y Pallmall.

El método utilizado para la preparación del agar tabaco es el mismo que describe Tendolkar et al, excepto que se utilizó el tabaco de tres marcas de cigarrillos en lugar de hojas de tabaco, se rompieron los cigarrillos de cada una de las tres marcas para obtener 25 gramos del tabaco, se colocó el contenido en tres frascos estériles de 1 litro con 500 ml de agua destilada, se mezcló y se puso a hervir durante 30 minutos, en baño maría posteriormente filtramos el contenido en probetas de 1 litro con la ayuda

de un embudo, colocando tres capas de gasa estéril por tres veces, luego se colocaron en tres frasco de vidrio estéril 10 gramos de AGAR MICROBIOLOGICAL (OXOID), y se vertió el filtrado para luego enrazar a 500ml con agua destilada.

Se midió su pH dando un valor de 5,4, los frascos fueron tapados y llevados a la autoclave por 15 minutos a 121°C, se dejó tomar una temperatura adecuada para luego proceder al plaqueado, se usaron 60 placas Petri descartables (90mm), siempre cuidando la esterilidad para lo cual nos ayudamos de un mechero.

Estas placas fueron llevadas a la estufa de 37°C por 12 horas para posteriormente pasar el control de calidad (contaminantes) de cada de ellas y así proceder al sembrado de las cepas en cada placa.

de las 20 placas con el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Hamilton se dividieron en dos cada una de ellas para ser sembradas en el lado izquierdo *Candida albicans* y el lado derecho *Candida dubliniensis* para observar mejor las características que presenten cada una de ellas, de la misma forma se realizaron los sembrados en las 20 placas con el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Premier y las 20 placas con el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Pallmall; las placas ya sembradas con las cepas fueron llevadas a la estufa a una temperatura de 28 °C por 96 horas, siendo observadas diariamente sus características de cada una de las levaduras aisladas en la ficha que se muestra en los

anexos para ello se tomaron nota de las siguientes características morfológicas macroscópicas, microscópicas y el tiempo de crecimiento de ambas lavaduras.

3.6. ASPECTOS ETICOS:

Se mantuvo la confiabilidad de los datos de acuerdo a los lineamientos de las buenas prácticas clínicas del manual de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud y el código de ética del tecnólogo médico, durante el tiempo que duro el desarrollo de investigación.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS

En el presente trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

En el agar tabaco, preparado con el tabaco del cigarro Hamilton, se describen las siguientes características morfológicas (color, aspecto, tamaño y la presencia o ausencia de festones), que presentan ambas levaduras a las 96 horas de crecimiento de ser aisladas.

Evaluación del agar tabaco preparado con el tabaco de cigarro hamilton				
Tiempo de crecimiento	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida dubliniensis</i>	
	Características macroscópicas	Características microscópica	Características macroscópicas	Características microscópica
24 horas	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas brillantes	se observan levaduras de bordes regulares	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas	se observa levaduras
48 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño y con bordes regulares	se observan las levaduras de bordes regulares	se observan colonias de color marron brillante, rugosas, de tamaño variado, con borde irregular	Se observan levaduras y presencia de flecos
72 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño y con bordes regulares	se observa levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño variado, con borde irregular y la presencia de un halo alrededor de las levaduras	se observan levaduras de bordes irregulares y presencia de flecos
96 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño y con bordes regulares	se observa levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño variado, con borde irregular y la presencia de un halo alrededor de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos

Tabla N°02: Características morfológicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Hamilton.

En el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Premier se pueden describir las características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) en ambas levaduras a las 96 horas de ser aisladas, las que se detallan en la tabla N°03.

Evaluación del agar tabaco preparado con el tabaco de cigarro premier				
Tiempo de crecimiento	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida dubliniensis</i>	
	Características macroscópicas	Características microscópica	Características macroscópicas	Características microscópica
24 horas	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas brillantes	se observan levaduras	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas	se observa levaduras
48 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño medianas y con bordes regulares	se observan levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de aspecto rugoso, tamaño variado, con bordes irregulares	se observan levaduras y presencia de flecos
72 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de diversos tamaños, con bordes regulares	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño medianas a grandes con borde irregular y la presencia de un halo bien marcado alrededor de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos
96 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de diversos tamaños, con bordes regulares	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño medianas a grandes con borde irregular y la presencia de un halo bien marcado alrededor de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos

Tabla N°03: Características morfológicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Premier.

Finalmente, con el agar tabaco, preparado con el tabaco del cigarro Pallmall, se describe las características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) a las 96 horas de ser aisladas ambas levaduras; cada característica se detalla en la tabla N°04.

Evaluación del agar tabaco preparado con el tabaco de cigarro Pallmall				
Tiempo de crecimiento	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida dubliniensis</i>	
	Características macroscópicas	Características microscópica	Características macroscópicas	Características microscópica
24 horas	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas brillantes	se observan levaduras	se observan colonias en forma de lluvia de rocío, de color blanquecinas brillantes	se observa levaduras
48 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño, con bordes bien definidos	se observa abundantes levaduras de bordes regulares	se observan colonias de color marron brillante, con aspecto rugoso, de tamaño pequeño a mediano, de bordes irregulares y observandose un halo tenue alrededor de de las levaduras	se observan levaduras y presencia de flecos
72 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño, con bordes bien definidos	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, con aspecto rugoso, de tamaño pequeño a mediano, de bordes irregulares y observandose un halo bien marcado alrededor de de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos
96 horas	se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño, con bordes bien definidos	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, con aspecto rugoso, de tamaño pequeño a mediano, de bordes irregulares y observandose un halo bien marcado alrededor de de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos

Tabla N°04: Características morfológicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Pallmall.

Por lo tanto, se pudo evaluar los medios de agar tabaco preparado con en el tabaco de las tres marcas de cigarros (Hamilton, Premier y Pallmall) a las 72 horas de ser aisladas ambas levaduras, tiempo que se pudo observar las características bien definidas y marcadas en los tres medios evaluados, resaltando las características ya constantes que se detallan las siguientes características en la tabla N°05.

Evaluación del agar tabaco en las tres marcas de cigarros a las 72 horas				
Medios	<i>Candida Albicans</i>		<i>Candida Dubliniensis</i>	
	Macroscópicas	Microscópica	Macroscópicas	Microscópica
Agar Tabaco hamilton	Se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño y con bordes regulares	se observa levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño variado, con borde irregular y la presencia de un halo alrededor de las levaduras	se observan levaduras con bordes festoneados
Agar Tabaco premier	Se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de diversos tamaños, con bordes regulares	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, de tamaño medianas a grandes con borde irregular y la presencia de un halo bien marcado alrededor de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos
Agar Tabaco pallmall	Se observan colonias de color blancas brillantes, lisas, de tamaño pequeño, con bordes bien definidos	se observa abundantes levaduras de bordes regulares, no se observan flecos al rededor de las levaduras	se observan colonias de color marron brillante, con aspecto rugoso, de tamaño pequeño a mediano, de bordes irregulares y observandose un halo bien marcado alrededor de de las levaduras	se observan levaduras con abundantes flecos

Tabla N° 05: Comparación de las características de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarros (Hamilton, Premier y Pallmall).

4.2. DISCUSION

En nuestro país, se observa el incremento de pacientes con infecciones causadas por hongos oportunistas y el incremento de pacientes con VIH, presentando diversidad de manifestaciones clínicas, una de ellas son las lesiones orofaríngeas^(411,27,30), que son causadas por hongos oportunistas, la mayoría es causada por *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, estas presentan una estrecha relación filogenética, poseen la capacidad de adherencia, secretan proteínas, producción de tubo germinativo y clamidosporas, las consecuencias de sus semejanzas en un laboratorio microbiológico puede conllevar a la identificación errónea de *Candida albicans* como *Candida dubliniensis* o viceversa, a pesar de estas semejanzas estas especies muestran diferencias en los niveles de resistencia a los antifúngicos y la capacidad de causar infecciones.^(8,10,12-14,23)

Candida dubliniensis ha ganado importancia como patógeno oportunista debido a su predisposición a generar rápidamente resistencia al fluconazol.^(2,8,16,17,20)

Podemos observar que los medios trabajados a base de extracto de semillas y plantas tales como el tabaco bajo ciertas condiciones de cultivo, son capaces de diferenciar a *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* mediante la observación macroscópica y microscópica, la presencia de clamidosporas sería un marcador específico para la especie de *Candida dubliniensis*,^(16,20,21,29,30).

El propósito de nuestro trabajo fue evaluar el agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos (Hamilton, Premier y Pallmall), para diferenciar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*; en el trabajo observamos que a las 72 horas de ser aislados las cepas en el agar tabaco se pueden observar las características morfológicas bien definidas, tanto las características macro y microscópicamente en ambas levaduras; e incluso vemos que el agar preparado con el tabaco del cigarrillo Pallmall marcó mejor las diferencias en *Candida dubliniensis*, presentando un marcado halo alrededor de la levadura por la presencia de festones, las colonias están mejor definidas presentando un color marrón brillante, de bordes irregulares, de tamaños medianas a grandes, y microscópicamente observamos abundantes festones alrededor de la levadura.

Posteriormente se realizaron microcultivos a los tres agares preparados con el tabaco de los cigarrillos Hamilton, Premier y Pallmall para observar las clamidoconidias que es una de las características que ayudan a diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*; se observó que en los tres medios usados se pudo ver las clamidoconidias en gran cantidad, previamente estas fueron coloreadas con azul de lactofenol, cumpliéndose así que *Candida dubliniensis* es la única que presenta las clamidoconidias a diferencias de *Candida albicans* en este agar tabaco según estudios realizados anteriormente.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- El agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarros locales (Hamilton, Premier y Pallmall); observándose las diferencias de ambas levaduras sin ninguna complicación, dificultad y sin ninguna contaminación del medio propuesto teniendo una buena especificidad para hacer la diferenciación de estas dos especies.
- También Se pudo determinar el tiempo de crecimiento de estas dos especies a una temperatura de 28 °C, como manifiestan estudios de investigación realizados con anterioridad. Determinando así que el tiempo óptimo para su crecimiento es a las 72 horas posterior a su aislamiento.
- Con respecto a las características macroscópicas; se pudo definir con claridad la diferencia de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el medio agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarro, siendo las características más resaltantes el color, forma, tamaño y la difusión de los festones principalmente en *Candida dubliniensis*.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio en los hospitales de nuestra ciudad, de preferencia en la población de pacientes con VIH tanto adulta como pediátrica que presenten lesiones orofaríngea, para poder validar el agar tabaco preparado con el tabaco de estas tres marcas de cigarrillos (Hamilton, Premier y Pallmall) por ser sencillo, de fácil acceso y económico para su preparación, para poderlo usar como medio de aislamiento primario para la diferenciación de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*.
- Se recomienda realizar aislamientos de otras especies del género *Candida* tales como, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, etc. En el agar tabaco preparado con el tabaco de tres marcas de cigarrillos (Hamilton, Premier y Pallmall) para comparar diferencias macroscópicas y microscópicas con respecto a *Candida dubliniensis*.

REFERENCIAS

1. Jackson A, Gamble J, Yeomans T, Moran P, Saunders D, Harris D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res* [Internet]. 2009; 19(12):2231–44. Available from: wos: 0002722734000081.
2. Quintana S, Sjöstrom P, Baldeón G, Socarrás D, Paz M, Molina A. Genome of *Candida albicans* and drug resistance. *Salud Uninorte*. 2017;33(3):438–50.
3. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2017; 34(2):72–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140616300857>
4. Livério HO, Ruiz L da S, de Freitas RS, Nishikaku A, De Souza AC, Paula CR, et al. Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017; 59(March 2016).
5. Sánchez-Hernández JA, González-Belén L, Rojas-Valderrama K, Muñoz-Zurita G. Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. *Atención Fam* [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017;24(1):18–22. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405887117300056>

6. Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Nardin ME, Méndez E, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2016;48(1):43–9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0325754115001492>
7. Gamarra S, Mancilla E, Dudiuk C, Garcia-Effron G. *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* differentiation by colony morphotype in Sabouraud-triphenyltetrazolium agar. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):126–8.
8. Carballo M. Identificación fenotípica de *Candida dubliniensis*, aisladas de candidiasis de mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. Universidad Nacional del NOreste; 2015.
9. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
10. Mattei AS. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
11. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: ¿Why Is *C. albicans* more pathogenic? *Int J Microbiol*. 2012;2012.
12. Godoy P, Zaror L, Otth C. Caracterización Fenotípica Y Molecular De *Candida Albicans* Y *Candida Dubliniensis* En Muestras Clínicas. Universidad Austral de Chile. 2012.

13. Albaina O. Caracterización de aislamientos atípicos de *Candida dubliniensis*. Tesis. Universidad del País Vasco; 2012. Disponible en: <https://addi.ehu.es/handle/10810/11588>
14. García J. Epidemiología de Candidemias y Utilidad de Métodos Rápidos de Diagnóstico. Universidad Autónoma de Madrid; 2012.
15. De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Enero -Junio [Internet]. 2012;26(1):43–55. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2611/261123426005.pdf>
16. Camacho LD, Mata ES, Pardi G, Pineda V, Rosello A, Collela MT. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* Evaluation. Kasmera. 2012;40(1):47–58.
17. Ahmad S, Khan Z, Joseph L, Asadzadeh M, Theyyathel A. Genotypic heterogeneity and molecular basis of 5-flucytosine resistance among *Candida dubliniensis* isolates recovered from clinical specimens in Kuwait. Med Mycol. 2012; 50 (3):244–51.
18. Díaz K. Manual De Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud. Colombia. 2014. 2-97 p.
19. Negroni R, Guelfand L, Perrone M. Manual De Medios Y Reactivos Del Laboratorio De Micología. Gob La Ciudad Buenos Aires Red [Internet]. 2011; 2:1–50. Disponible en: <http://www.uca.edu.ar/uca/common/grupo11/files/micologia-2013/Manual-de-Medios-y-Reactivos.pdf>

20. Bartoli M, Cingolani B, García-Effron S. Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Propuesta de una secuencia de identificación. Rev FABICB. 2011; 15:138–50.
21. Silveira-Gomes F, Sarmiento DN, Espírito-Santo EPT do, Souza N de O, Pinto TM, Marques-da-Silva SH. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2011; 44(4):457–60. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000400011&lng=en&tlng=en
22. Aguilera II. Estudio de pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *candida albicans*. [Internet]. 2010. Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-37003-X_2%5Cnhttp://www.aguasulfurada.com/aguas.php%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.037%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939915000887%5Cnhttp://laslevaduras.mex.tl/%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1
23. Loaiza M. Expresión de genes SAP (codificantes de aspartil proteasas) de *Candida dubliniensis* en diferentes condiciones fisiológicas y durante la infección experimental de queratinocitos. Instituto Politécnico Nacional; 2008.
24. 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):211–7.
25. Gómez CQ, Hidalgo LM, Varela MU. Ginecología *Candida Dubliniensis*: Importancia en pacientes Inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans* (Revisión Bibliográfica). 2007; (578):43–8.

26. Perurena M, Fernández C, Martínez G, Fernández M, Machín G. *Candida dubliniensis*: necesidad de establecer un diagnóstico correcto. Rev. Cuba Med Trop. 2006;58(3):261–3.
27. Papone V. *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* patógenos orales oportunistas fenotípicamente y filogenéticamente relacionados. Rev la Fac Odontol la Univ Católica del Uruguay. 2006; Vol III (N. 1):36–41.
28. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Ten years on. FEMS Microbiol Lett. 2005; 253(1):9–17.
29. Girish C, Menon T. Tobacco agar: A new medium for chlamydosporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Med Mycol. 2005;43(5):473–5.
30. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. 2004;42(10):4796–8.
31. Guevara M, Urcia F. Manual De Procedimientos Y Técnicas De Laboratorio Para La Identificación De Los Principales Hongos Oportunistas Causantes De Micosis Humanas. 2007. 1-72 p.

ANEXOS VII

ANEXO N°1. FICHA DE REGISTRO DE DATOS

Nº de Ficha:

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

Evaluación Del Agar Tabaco preparado con el Tabaco de tres marcas de cigarros, para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*

Fecha de lectura: ____/____/____

- 1) Crecimiento de colonias
 - a) Creció
 - b) No creció

- 3) tamaño de colonias
 - a) Pequeñas
 - b) Medianas
 - c) Grandes

- 4) color de colonias
 - a) blancas cremosas
 - b) marrón brillante
 - c) incoloras

- 5) Examen microscópico
 - a) creciente de flecos y clamidosporas
 - b) no crecimiento flecos y clamidosporas

Responsables:

ANEXO N°2:

MEDIO DE CULTIVO AGAR TABACO MODIFICADO

COMPOSICIÓN

Tabaco	50gr
Agua destilada	1000 ml
Agar	20 gr

MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

- Se rompen 2 atados de cigarrillos (Marlboro) y se vuelca el tabaco en un Erlenmeyer con 1L de agua destilada.
- Hervir durante 30 minutos a Baño María. Filtrar a través de gasa y corregir volumen a 1L
- Agregar 20g de agar, mezclar bien. Ajustar el pH a 5.4
- Autoclavar a 121°C durante 15 min.
- Plaquear a razón de 20 ml por placa.

CONSIDERACIONES:

- Su pH final es de 5,4 +/- 0,2 a 28°C.
- Almacenar los medios preparados en 2-8°C.
- Guardar la paca que contiene el medio de cultivo a 37°C. para realizar su control respectivo.

ANEXO N°3:

RECONOCIMIENTO DE *Candida albicans* Y *Candida dubliniensis*



Figura 8: cepas aisladas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en el agar Sabouraud, aislamiento primario.



Figura 9: sembrado de las cepas en los respectivos medios de agar preparados con el tabaco de los cigarrillos (Hamilton, Premier y Pallmall).

Características macroscópicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco de los cigarros (Hamilton, Premier Y Pallmall) a las 72 horas de su aislamiento.

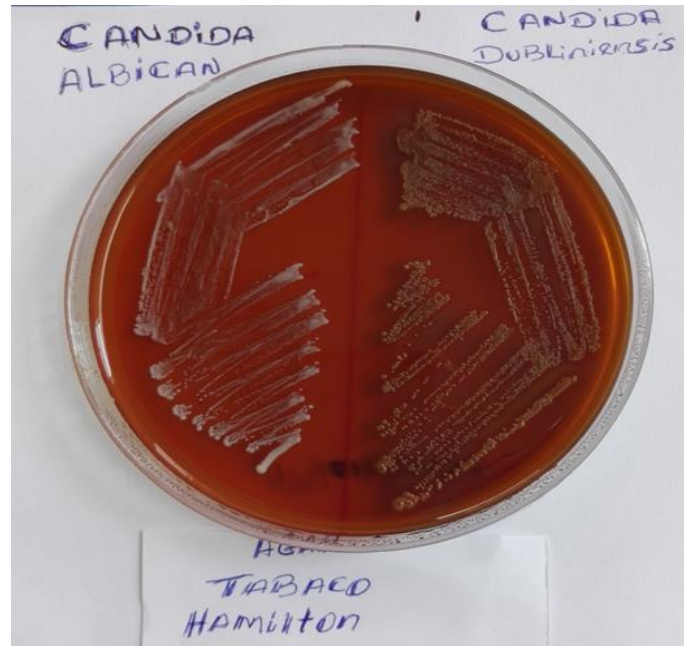


Fig. 10: Crecimiento de *candida albicans* y *candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Hamilton.

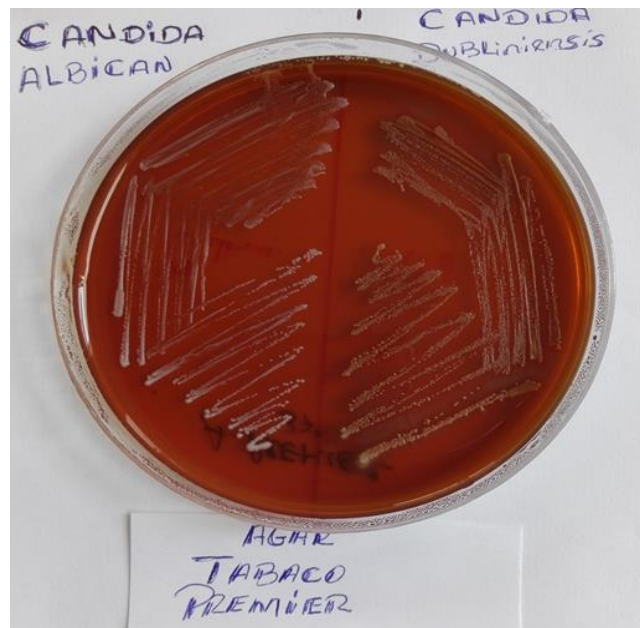


Fig. 11: Crecimiento de *candida albicans* y *candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Premier.

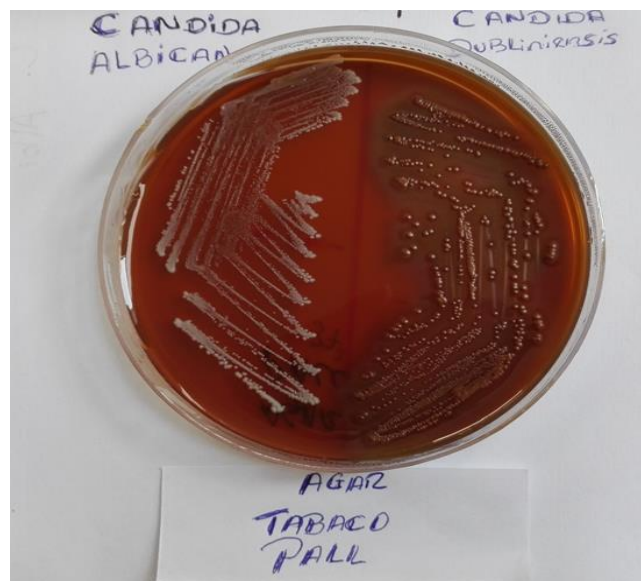


Fig. 12: Crecimiento de *candida albicans* y *candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del cigarro Pallmall.

Anexo 05

Características microscópicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del **cigarro Hamilton** a las 72 horas de su aislamiento.

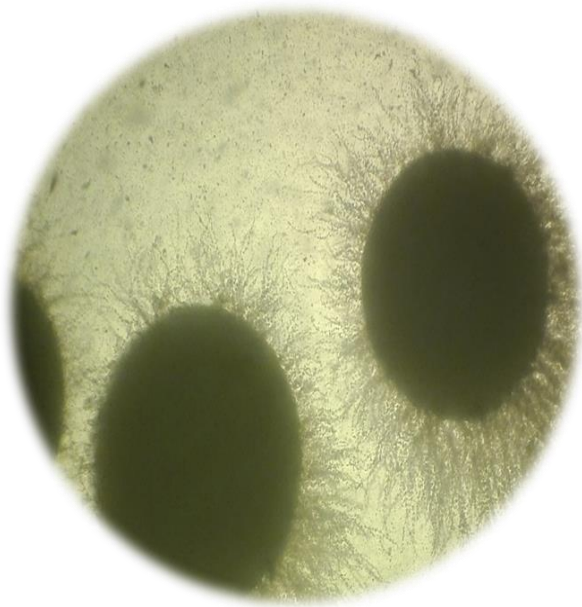


Fig. 13 *Candida dubliniensis*:
presencia de festones a las 72 horas.



Fig. 14 *Candida albicans*:
ausencia de festones a las 72

Características microscópicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del **cigarro Premier** a las 72 horas de su aislamiento.

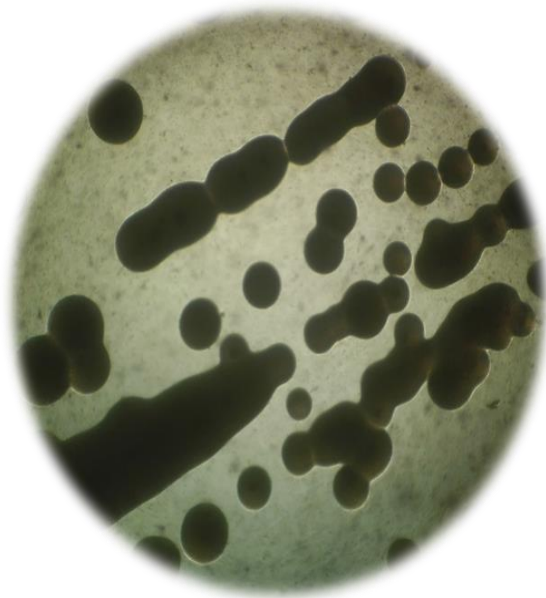


Fig. 15 Levaduras de *Candida albicans* a las 72 horas de incubación ausencia de festones

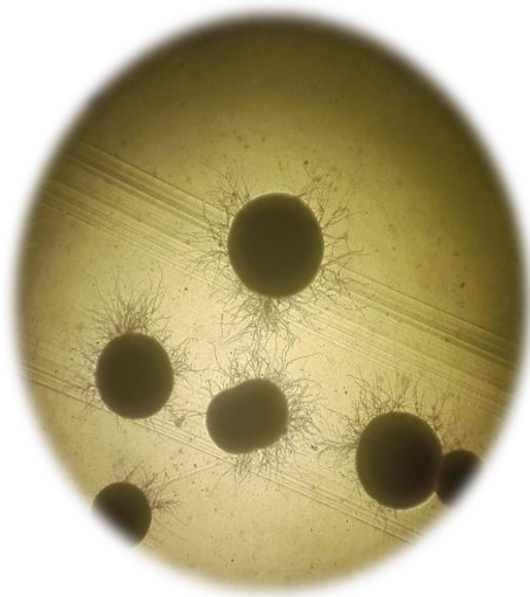


Fig. 16 Levaduras de *Candida dubliniensis* a las 72 horas de incubación presencia de festones.

Características microscópicas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* evaluadas en el agar tabaco preparado con el tabaco del **cigarro Pallmall** a las 72 horas de su aislamiento.

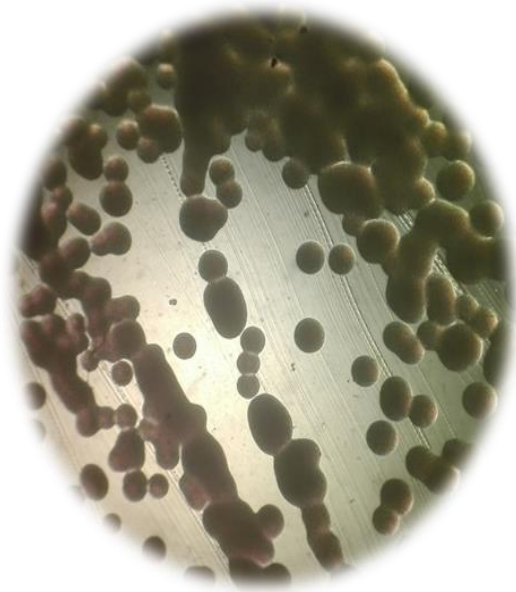


Fig. 17 Levaduras de *Candida albicans* a las 72 horas de incubación ausencia de festones

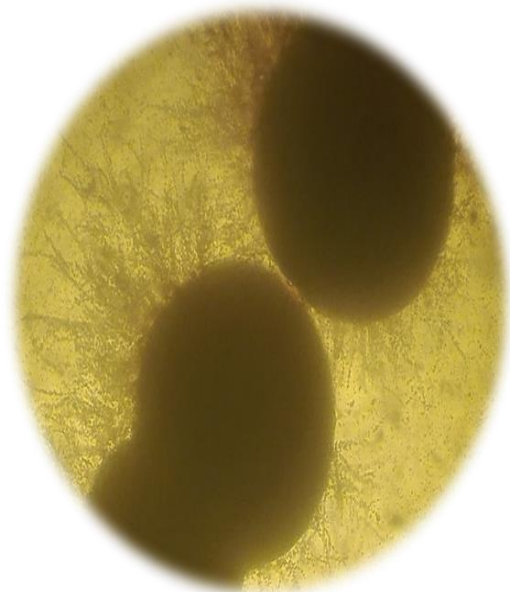


Fig. 18 Levaduras de *Candida dubliniensis* a las 72 horas de incubación presencia de abundantes festones.

Anexo 06

Observación de las clamidoconidias en el agar tabaco preparado con el tabaco de los cigarrillos Hamilton, Premier y Pallmall a las 72 horas de incubación.

Para lo cual se realizó un microcultivo y una coloración con el azul de lactofenol

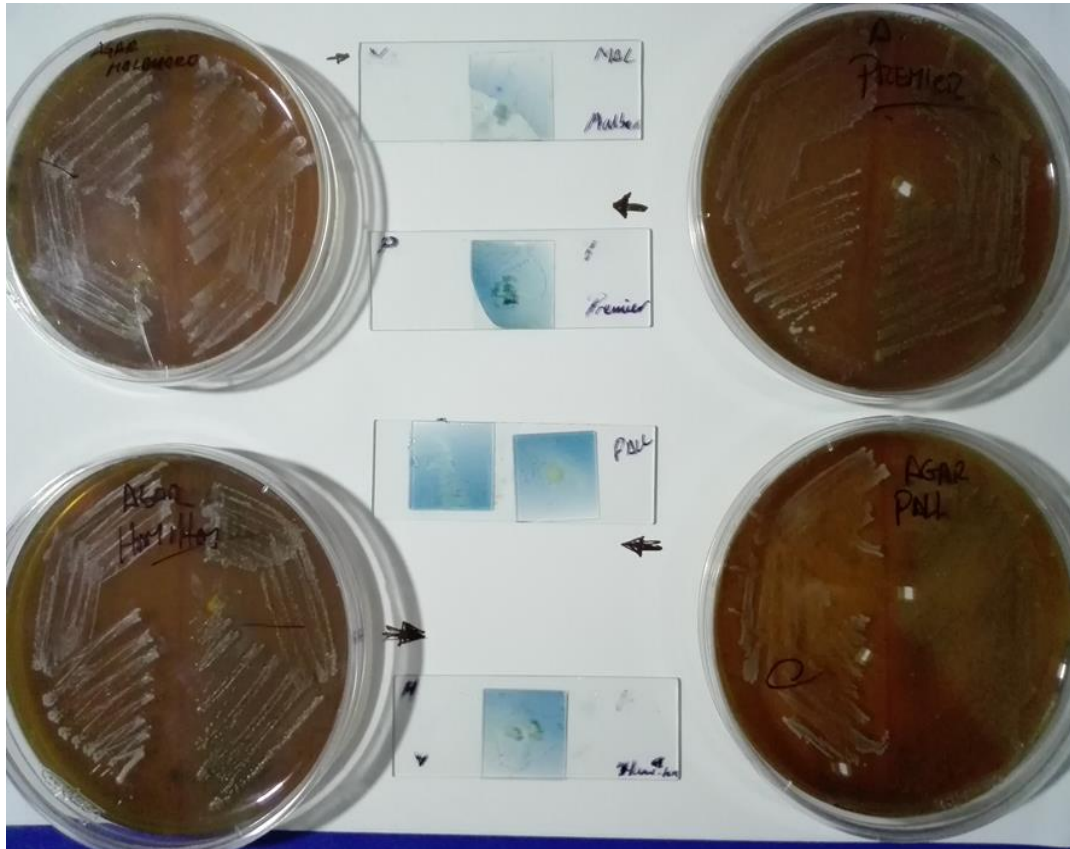


Fig. 19 microcultivos para observar las clamidosporas de *Candida dubliniensis*.

Presencia de clamidosporas en los microcultivos realizados del agar tabaco preparado con el tabaco de cigarro (Pallmall, Hamilton y Premier)

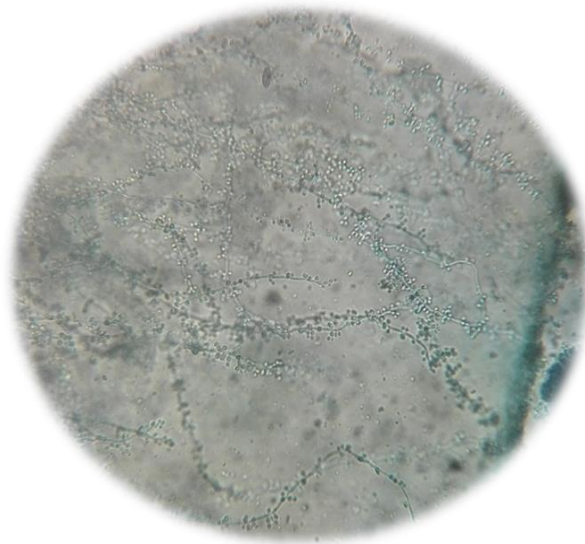


Fig. 20 Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Pallmall.

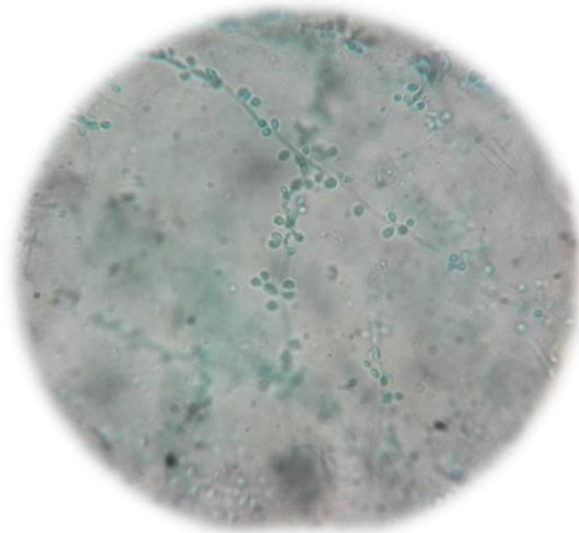


Fig. 21 Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Hamilton.

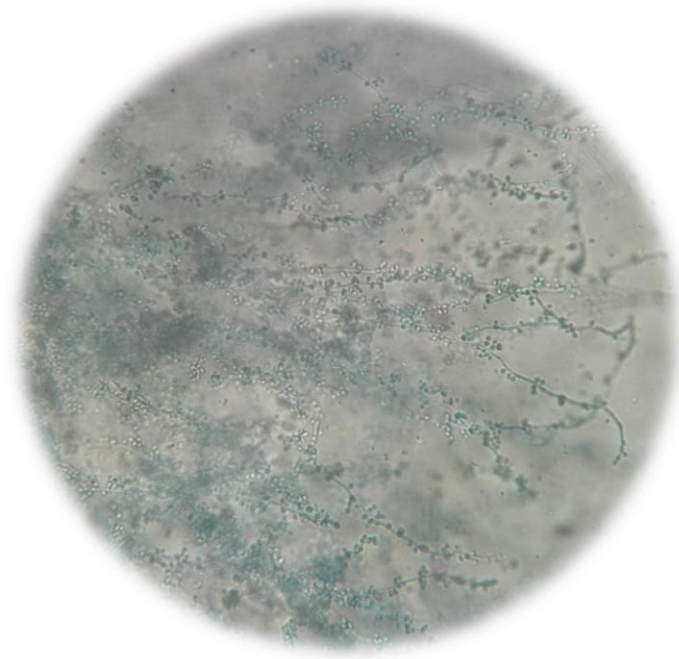


Fig. 22 Clamidosporas de *Candida dubliniensis* observadas a 100x, aisladas en el agar tabaco Premier.

Anexo N° 7

PICTOGRAMA DE TRABAJO



