

# Identificación rápida de *Candida dubliniensis* mediante la prueba Bichro-Dubli®

Ismail H. Sahand<sup>a</sup>, Rebeca Ortiz<sup>b</sup>, Javier Pemán<sup>b</sup>, María D. Moragues<sup>c</sup>, Guillermo Quindós<sup>a</sup> y José Pontón<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Lejona.

<sup>b</sup>Servicio de Microbiología. Unidad de Micología. Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>c</sup>Departamento de Enfermería I. Universidad del País Vasco. Lejona. España.

**OBJETIVOS.** Debido a su interés epidemiológico, la correcta identificación de *Candida dubliniensis* debería introducirse de forma sistemática de los laboratorios de Microbiología Clínica. Para facilitar esta labor, se evalúa la idoneidad de la nueva prueba rápida Bichro-Dubli® (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, Francia).

**MÉTODOS.** Se estudiaron 75 cepas de colección (55 *C. dubliniensis* y 20 *C. albicans*) y 135 aislamientos clínicos de levaduras que crecieron como colonias verdes en CHROMagar Candida.

**RESULTADOS.** La prueba Bichro-Dubli® fue positiva en 54 de las 55 cepas de *C. dubliniensis* (sensibilidad 98,2%) y negativa en las 20 cepas de *C. albicans* (especificidad 100%). La prueba identificó los 4 aislamientos de *C. dubliniensis* presentes en 135 aislamientos cultivados de muestras clínicas.

**CONCLUSIONES.** Bichro-Dubli® es una prueba de fácil realización que permite la identificación rápida de *C. dubliniensis*.

**Palabras clave:** *Candida dubliniensis*. Bichro-Dubli®. Candidiasis. Diagnóstico de laboratorio.

Rapid identification of *Candida dubliniensis* using the Bichro-Dubli® test

**OBJECTIVES.** Because of its considerable epidemiological relevance, accurate identification of *Candida dubliniensis* should be routinely performed in clinical microbiology laboratories. In an attempt to facilitate this task, the usefulness of the Bichro-Dubli® test (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France) was assessed.

**METHODS.** Seventy-five collection strains (55 *C. dubliniensis* and 20 *C. albicans*) and 135 clinical yeast isolates that grew as green colonies in CHROMagar Candida were studied.

**RESULTS.** Bichro-Dubli® was positive in 54 of 55 *C. dubliniensis* strains (sensitivity 98.2%) and negative in the 20 *C. albicans* strains (specificity 100%). The test identified 4 *C. dubliniensis* isolates among the 135 isolates cultured from clinical specimens.

**CONCLUSIONS.** The Bichro-Dubli® test is easy to perform and allows rapid identification of *C. dubliniensis*.

**Key words:** *Candida dubliniensis*. Bichro-Dubli®. Candidiasis. Laboratory diagnosis.

## Introducción

Diez años después de su descripción, *Candida dubliniensis* se aísla con una frecuencia creciente en todo el mundo, tanto de muestras clínicas orales y vaginales como profundas<sup>1-4</sup>. La incidencia de *C. dubliniensis* varía según el tipo de hospital, y se ha comunicado que representa el 3,3% de los aislamientos tradicionalmente identificados como *C. albicans*<sup>5</sup> y el 7% de las candidemias<sup>6</sup> en hospitales universitarios.

El aumento del número de aislamientos de *C. dubliniensis* hace necesaria su correcta identificación en el laboratorio, ya que puede tener implicaciones epidemiológicas y terapéuticas<sup>1,7</sup>. Sin embargo, la identificación de *C. dubliniensis* es difícil por la semejanza fenotípica que presenta con *C. albicans*, lo cual obliga a menudo a realizar pruebas especiales poco asequibles en el laboratorio de Microbiología clínica.

Para la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* se utilizan tanto pruebas genotípicas como fenotípicas<sup>1</sup>. Las pruebas genotípicas, que incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos y el empleo de sondas, se consideran el método más fiable de identificación de *C. dubliniensis*, aunque, por su sofisticación, no están al alcance de la mayoría de laboratorios. Las pruebas fenotípicas se usan con mayor frecuencia e incluyen el crecimiento a 45 °C, el color de las colonias en medios cromógenos, la producción de clamidosporas, el perfil de asimilación de carbohidratos y la reactividad con anticuerpos anti-*C. dubliniensis*.

La prueba Bichro-Dubli® (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, Francia) utiliza un látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal 12F7-F2 que reacciona con un antígeno específico de la superficie de la pared celular de *C. dubliniensis*<sup>8</sup>. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la utilidad de esta prueba para la identificación de *C. dubliniensis*, tanto en cepas de colección como en aislamientos clínicos recientes.

Correspondencia: Dr. J. Pontón.  
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.  
Apartado 699, 48080 Bilbao. Vizcaya. España.  
Correo electrónico: jose.ponton@ehu.es

Manuscrito recibido el 14-7-2006; aceptado el 29-1-2007.

## Métodos

### Cepas de colección y muestras clínicas

Las cepas utilizadas en este estudio (55 de *C. dubliniensis* y 20 de *C. albicans*) procedían de la Colección de Hongos del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco; Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda (cepas CBS 2747, CBS 8500 y CBS 8501); National Collection of Pathogenic Fungi, Bristol, Reino Unido (cepa NCPF 3949), y la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España (cepa CECT 11473). La identidad de las cepas de colección se confirmó por el perfil de asimilación de azúcares con la prueba API ID 32C (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y por PCR con cebadores específicos basados en la secuencia de la ADN topoisomerasa II<sup>9</sup>. Los cuatro genotipos descritos en *C. dubliniensis* se determinaron de acuerdo con la técnica descrita por Brena et al<sup>9</sup>. La utilidad de Bichro-Dubli® para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* en aislamientos clínicos se estudió con 135 aislamientos de 135 muestras clínicas (69 respiratorias, 25 urinarias, 12 orofaríngeas, 9 genitales, 6 cutáneas, 6 esofágicas, 3 de hemocultivos, 2 óticas, 1 peritoneal, 1 de absceso, 1 de punta de catéter) recibidas en la Unidad de Micología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Fe, en las que crecieron colonias de color verde en CHROMagar Candida (CHROMagar, París, Francia).

### Bichro-Dubli®

La identificación de *C. dubliniensis* con la prueba Bichro-Dubli® se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 2-3 colonias de color verde de cada aislamiento se resuspendieron durante 3-5 min en 20 µl del reactivo de látex con un palillo desechable. En la reacción positiva, las bolas de látex aglutinadas se desplazan progresivamente hacia la periferia, formando un anillo azul que deja el centro de la preparación de color rosado. En la reacción negativa no existe aglutinación y el reactivo mantiene el color púrpura original (fig. 1). La identidad de los aislamientos identificados por la prueba Bichro-Dubli® como *C. dubliniensis* se confirmó por los métodos fenotípicos y genotípicos mencionados en el apartado anterior.

## Resultados

La prueba Bichro-Dubli® fue positiva en 54 de las 55 cepas de *C. dubliniensis* de colección (sensibilidad 98,2%) y negativa en las 20 cepas de *C. albicans* de referencia (especificidad 100%). Los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* fueron positivos con la prueba Bichro-Dubli®, aunque la aglutinación de las cepas del genotipo 4 era más lenta. Bichro-Dubli® identificó 4 aislamientos de *C. dubliniensis* en las 135 muestras clínicas que habían dado colonias verdes en CHROMagar Candida. Sin embargo, esta identificación no habría sido posible por el color de las colonias, ya que las 4 cepas de *C. dubliniensis*, aisladas en un lavado broncoalveolar, un esputo y dos frotis orales, dieron lugar a colonias de color verde que eran indistinguibles de las producidas por *C. albicans*.

Dada la baja incidencia de *C. dubliniensis*, y en un intento de ahorrar costes evitando tener que realizar la prueba Bichro-Dubli® a todos los aislamientos que dan color verde en CHROMagar Candida, se propone un algoritmo para la identificación de *C. dubliniensis* en el laboratorio de Microbiología Clínica (fig. 2). Según este algoritmo, las colonias de color verde en CHROMagar Candida se siembran a 45 °C en agar glucosado de Sabouraud durante 24 h y los aislamientos que no crezcan se consideran de forma presuntiva de la especie *C. dubliniensis*, realizándose la identificación definitiva con la prueba Bichro-Dubli®.

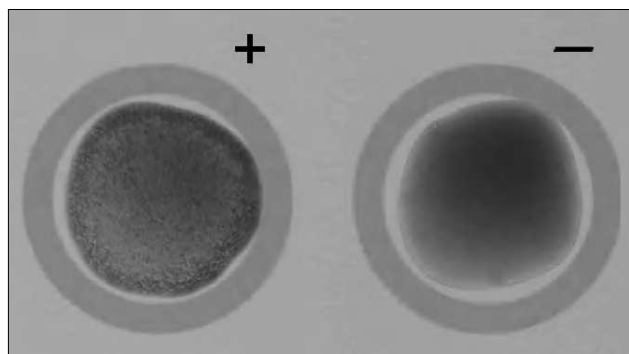


Figura 1. Resultado positivo (+) y negativo (-) con la prueba Bichro-Dubli®.

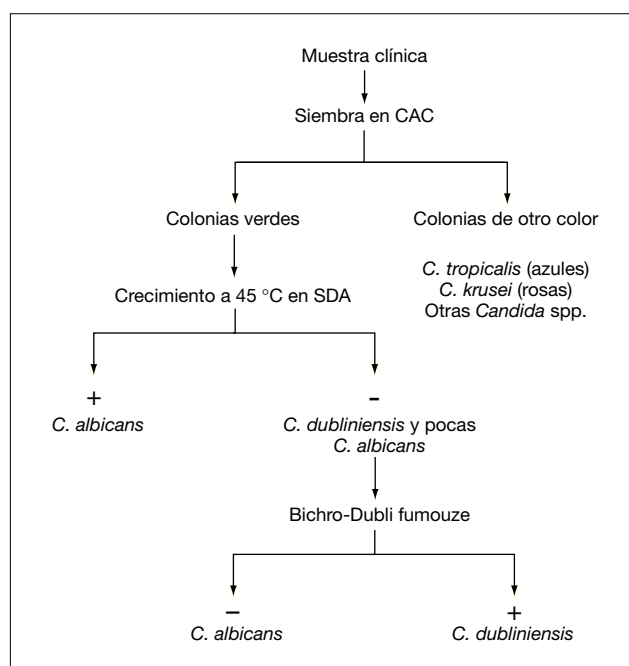


Figura 2. Algoritmo para la identificación de *C. dubliniensis* combinando el color de las colonias en CHROMagar Candida (CAC), el crecimiento a 45 °C en agar glucosado de Sabouraud (SDA) y la prueba Bichro-Dubli®.

## Discusión

La diferenciación rápida y sencilla entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* es difícil, ya que las técnicas más fiables requieren métodos genotípicos<sup>1</sup>. La utilización de medios cromógenos como el CHROM-Pal<sup>10</sup> o especiales como el agar caseína<sup>11</sup> permite esta diferenciación, pero no se utilizan habitualmente en los laboratorios de Microbiología Clínica. El crecimiento a 45 °C puede utilizarse para diferenciar *C. dubliniensis* y *C. albicans*, ya que *C. dubliniensis* no crece a 45 °C<sup>12</sup>. Sin embargo, aunque la mayoría de los aislamientos de *C. albicans* crece a 45 °C, se ha demostrado que el 36% de los aislamientos de *C. albicans* no crece a esa temperatura<sup>13</sup>.

Una prueba como Bichro-Dubli®, basada en la aglutinación de partículas de látex, puede ser más utilizada en los laboratorios de Microbiología Clínica por su sencillez. Los resultados presentados en este estudio confirman estudios

previos<sup>8,14</sup> y ponen de manifiesto que la prueba Bichro-Dubli® permite la diferenciación rápida y sencilla entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Esta prueba es más barata (2,5 €/prueba) que la identificación por PCR con cebadores específicos (3,8 €/prueba). Sin embargo, dada la baja prevalencia de *C. dubliniensis* en las muestras clínicas, la aplicación del Bichro-Dubli® a todos los aislamientos de *C. albicans* puede resultar costosa.

Dada la amplia utilización de CHROMagar Candida en muchos laboratorios para el aislamiento e identificación presuntiva de levaduras y la incapacidad de *C. dubliniensis* para crecer a 45 °C, Bichro-Dubli® podría utilizarse para diferenciar *C. dubliniensis* y *C. albicans* entre aquellos aislamientos que den colonias de color verde en CHROMagar Candida y no crezcan a 45 °C. Bichro-Dubli® también podría ser de utilidad en la detección directa de *C. dubliniensis* en botellas de hemocultivo, como ha sido propuesto para *C. albicans*<sup>15</sup>.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos G03/075, RESITRA; PI050511, Infección y trasplante. Consolidación de Resitra en el marco Retics. Explotación de la cohorte Resitra, del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo y 9/UPV 0093.327-13550/2001 de la Universidad del País Vasco.

#### Bibliografía

- Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. FEMS Microbiol Lett. 2005;253:9-17.
- Salesa R, Moragues MD, Sota R, Pemán J, Quindós G, Pontón J. Specific antibody response in a patient with *Candida dubliniensis* fungemia. Rev Iberoam Micol. 2001;18:42-4.
- De Vos MM, Cuenca-Estrella M, Boekhout T, Theelen B, Matthijs N, Bausters T, et al. Vulvovaginal candidiasis in a Flemish patient population. Clin Microbiol Infect. 2005;11:1005-11.
- Kalkanci A, Kokturk N, Senol E, Acar K, Guzel O, Sancak B, et al. Could *Candida dubliniensis* be involved in lung fungus balls? Rev Iberoam Micol. 2005;22:157-9.
- Fotadar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. J Clin Microbiol. 2003;41:1907-11.
- Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K, Meiller TF, Venezia RA. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. Clin Infect Dis. 2005;41:1064-7.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2004;4:369-76.
- Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol. 2006;44:138-42.
- Brena S, Rubio MC, Salesa R, Iglesias I, Gil J, Rezusta A, et al. Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos. Rev Iberoam Micol. 2004;21:20-3.
- Sahand I, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROMagar Candida with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2005;43:5768-70.
- Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: A useful medium to differentiate *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003;41:1259-62.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1998;36:2093-5.
- Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, López-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol. 1998;36:3007-12.
- Sahand IH, Moragues MD, Robert R, Quindós G, Pontón J. Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze for the rapid identification of *Candida dubliniensis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;55:165-7.
- Laurent F, Cahen P, Honderlick P. Utilisation du réactif Bichrolatex albicans® pour l'identification rapide de *Candida albicans* dans les flacons d'hémoculture: resultats préliminaires. J Mycol Méd. 1996;6:19-21.