



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE *Candida dubliniensis*
AISLADAS DE PACIENTES CON CANDIDOSIS EN DIFERENTES
CENTROS DE SALUD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

EDUARDO FERNANDO HIGUERAY CENTENO
FERNANDO MANUEL ORTIZ BRAVO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2011

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
MUESTRA POBLACIONAL.....	7
TOMA DE MUESTRA.....	7
EXAMEN DIRECTO	8
CULTIVO	10
IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	11
Características morfológicas.....	11
Pruebas fisiológicas y bioquímicas	12
Producción de clamidoconidias:.....	13
Producción de color en medio cromogénico:	14
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFICACIA DE LAS PRUEBAS FENOTÍPICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>C. DUBLINIENSIS</i>	16
DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS (AZOLES).....	17
Cepas de referencia.....	18
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
Controles.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	38

RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
HOJAS DE METADATOS	48

DEDICATORIA

A

Dios quien ha sido nuestro guía y compañía en todos los momentos difíciles que hemos tenido que enfrentar en la vida.

Nuestros padres: Vladimir Higuerey, Flor Centeno, Fernando Ortiz, Josefina Bravo y Miriam González, quienes con esfuerzo y dedicación han formado a dos seres excepcionales, de buenos valores y ganas de triunfar.

AGRADECIMIENTO

A

La Profesora Evis Parra, que con paciencia, sabiduría y camaradería nos orientó e hizo posible la ejecución de este trabajo de investigación.

Jaime Mora, por cooperar y ayudarnos en todo momento durante la elaboración de esta tesis.

La Licenciada Mariangeles Bastidas por ayudarnos en la realización de la técnica de PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Examen al fresco con hidróxido de potasio (40X): a) blastoconidias; b) pseudohifas; c) leucocitos.....	9
Figura 2. Examen al fresco con tinción de Gram (100X): a levaduras, teñidas como estructuras Gram positivas); b) pseudohifas.	10
Figura 3. Colonias de <i>Candida albicans</i> en agar Sabouraud dextrosa	11
Figura 5. Cultivo de <i>Candida dubliniensis</i> en Corn Meal agar por la técnica de Dalmau, mostrando agrupamientos de blastoconidios dispuestos entre células de pseudohifas adyacentes: a) 10X; b) 40X.	12
Figura 6. Prueba de filamentización en suero humano a 37°C: a) tubo germinal de <i>C. albicans</i> (40X); b) tubo germinal de <i>C. dubliniensis</i> (40X).	13
Figura 7. Producción de clamidoconidias: a) <i>C. albicans</i> (40X); b) <i>C. dubliniensis</i> (40X).	14
Figura 8. Placas con medio Chromatic <i>Candida</i> . Aislamientos de presuntivas: a) <i>C. dubliniensis</i> y b) <i>C. albicans</i>	14
Figura 9. Prueba de fermentación de azúcares (zimograma): a) preparación de medios; b) <i>C. albicans</i> ; c) <i>C. dubliniensis</i>	16
Figura 10. Frecuencia de especies presuntivas de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> identificadas mediante métodos convencionales, según la procedencia de la muestra.	22
Figura 11. Productos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa, en gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), con cebadores DUBR/DUBF, que amplifica un fragmento específico para <i>C. dubliniensis</i> de 288 pb. M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1 y 2: cepas control; 3, 4 ,7 y 8: muestras negativas. 5 y 6: muestras positivas.	25
Figura 12. Susceptibilidad a azoles (fluconazol, voriconazol e itraconazol): a) <i>C. dubliniensis</i> ; b) <i>C. albicans</i>	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de cultivos positivos para <i>Candida</i> en muestras de pacientes hospitalizados y ambulatorios provenientes de diferentes centros de salud de Cumaná, estado Sucre. Febrero – Junio de 2010.	21
Tabla 2. Perfil fenotípico expresado en 51 cepas aisladas de diferentes tipos de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios en diferentes centros de salud de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.	22
Tabla 3. Porcentaje de sensibilidad, especificidad y eficacia de las pruebas fenotípicas para la identificación de <i>C. dubliniensis</i> en los diferentes tipos de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.	24
Tabla 4. Resultados de pruebas realizadas para la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.....	25
Tabla 5. Relación de los grupos fenotípicos con los resultados de la reacción en cadena polimerasa especie específica para <i>C. dubliniensis</i> de las cepas aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios en Cumaná, estado Sucre. Febrero–junio de 2010.	26
Tabla 6. Resultados de las pruebas de sensibilidad a fluconazol, itraconazol y voriconazol, utilizando el método de difusión en agar en cepas de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> provenientes de diferentes tipos de muestras en pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.	27
Tabla 7. Distribución porcentual de las cepas aisladas según el tipo de muestras, provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.	28
Tabla 8. Distribución de las cepas de <i>C. dubliniensis</i> , según edad, sexo y tipo de muestra, obtenidas de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.	29

Tabla 9. Resultados del análisis de la asociación entre el diagnóstico de *C. dubliniensis* con las variables clínicas y demográficas de los pacientes. 30

RESUMEN

Candida dubliniensis es una especie estrechamente relacionada con *Candida albicans*. La diferenciación de ambas especies por los métodos micológicos convencionales no es sencilla, razón por la cual se ha recurrido a técnicas moleculares para la correcta identificación de *C. dubliniensis*. En este sentido, en la presente investigación se identificó fenotípica y molecularmente a *Candida dubliniensis* en diferentes muestras obtenidas de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Se aislaron 150 levaduras entre los meses de febrero y junio de 2010. Para la identificación de las especies se estudió el color de las colonias en un medio con sustrato cromogénico (Chromatic *Candida*), la producción de clamidoconidias en agar harina de maíz con 1,0% de extracto de levadura; en este último medio, también se evaluaron las características micromorfológicas de las colonias utilizando la técnica de Dalmau. Cincuenta y un (51) aislamientos que desarrollaron color verde esmeralda en Chromatic *Candida*, produjeron tubos germinales en suero humano y clamidoconidias en agar harina de maíz, fueron identificados como presuntivas *C. albicans*. Para diferenciar cuales de ellos correspondían a *C. dubliniensis*, se utilizaron distintos métodos fenotípicos como la capacidad de desarrollo a 45°C y en NaCl al 6,5% y se evaluó la utilidad de cada técnica para obtener un esquema de identificación simple y confiable. A los aislados obtenidos se les realizó amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para *C. dubliniensis* y realizando modificaciones de la técnica inicial hasta llegar a estandarizar una prueba en el laboratorio, con el fin obtener una identificación definitiva de la especie. El 4,0% de los aislamientos correspondió a *C. dubliniensis*. No se pudo diferenciar entre ambas especies basándose en el color desarrollado en el medio Chromatic *Candida*. Las pruebas fenotípicas que resultaron más sensibles y específicas fueron: crecimiento en medio con NaCl al 6,5% y desarrollo a 45°C. La PCR demostró ser una técnica útil para diferenciar entre ambas especies. Se recomienda utilizar, por lo menos, 3 métodos fenotípicos diferentes para discriminar entre estas dos especies. encontraron, ya que probablemente utilicen esta área como de resguardo larval, debido a la relativamente alta concentración de alimento. Los análisis muestran un comportamiento esperado, ya que la mayoría de las especies de peces costeros del área, aprovechan la tranquilidad de las aguas y las relativamente elevadas concentraciones de nutrientes que proporciona la zona de estudio.

INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la humanidad el hombre se ha relacionado con los hongos, beneficiándose de ellos en algunos casos; en otros, ocasionan daños de forma directa o indirecta en animales, plantas y alimentos. Los hongos constituyen un complejo grupo de organismos, tan grande que se calculan más de 300 000 especies. Estos son organismos heterótrofos, carentes de clorofila, con reproducción sexual mediante ascosporas y asexual por gemación, y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; los cuales por factores determinados, pueden convertirse en patógenos para el hombre, provocando lo que se conoce como micosis (Arenas, 2003; Bennett y Klich, 2003).

En la micología médica, los hongos de interés, adoptan dos formas fundamentales: filamentos y levaduras. El cuerpo de un hongo filamentoso tiene dos porciones, una reproductiva y otra vegetativa. La parte vegetativa, que es haploide y generalmente no presenta coloración, está compuesta por filamentos llamados hifas; un conjunto de hifas conforma el micelio; a menudo las hifas están divididas por tabiques llamados septos. Por otra parte, los hongos levaduriformes, o simplemente levaduras, son siempre unicelulares, de forma casi esférica. No existe en ellos una distinción entre cuerpo vegetativo y reproductivo. Las levaduras son muy parecidas a las bacterias, macroscópicamente, pero son más cremosas y los colores que presentan son blancos, beige o un poco más oscuros. Algunas son rosadas o rojas por la presencia de carotenoides (Kobold, 2000).

Dentro de las levaduras, se encuentra el género *Candida*, para el que se han descrito aproximadamente 163 especies. Esta levadura es dimórfica y se encuentra en el humano en diferentes fases fenotípicas: como hongos filamentosos (seudohifas), o como levaduras. El género *Candida* acompaña normalmente la vida del individuo sano; es decir, es saprófita, pero

cuando la eficacia del sistema inmunitario (primario o secundario) se reduce por el aumento de la presencia de las toxinas endógenas y exógenas, esto causa notables problemas para la salud del individuo en cuestión. Por eso estos microorganismos constituyen los agentes etiológicos de micosis oportunistas por excelencia, actuando principalmente, cuando hay alteraciones de la inmunidad celular, como es el caso de pacientes inmunosuprimidos, donde la gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del paciente, más que de las propiedades patógenas del hongo (Casas, 1994; Gorther, 1996; López-Ribot *et al.*, 2000; Mendoza y Díaz, 2001).

Las especies del género *Candida*, representan un grupo de levaduras con características muy diversas; forman parte de la microbiota del hombre, colonizando mucosas del tracto gastrointestinal (60,0%), boca (40,0%), vagina (15,0%) y piel (6,0%). Microscópicamente se observan como células redondeadas, ovals o gemantes. Se hayan distribuidas a nivel mundial, con mayor frecuencia en climas cálidos y húmedos, su potencial patógeno varía considerablemente entre las distintas especies, siendo *Candida albicans*, el microorganismo capaz de producir con más frecuencia enfermedades mortales, debido a los diferentes factores de virulencia que puede desarrollar (adherencia a células epiteliales y endoteliales, síntesis de enzimas hidrolíticas, formación de hifas y pseudohifas, cambios fenotípicos, modulación antigénica, entre otros), ocasionando así severos daños (Delgado *et al.*, 1996; Cantón *et al.*, 2001).

Las infecciones fúngicas intrahospitalarias producidas por *C. albicans* son cada vez más frecuentes, afectando en un 30,0-40,0% de la población; generando así, una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en aquellos pacientes con factores de riesgo para adquirirlos, como son los casos de pacientes que presentan: inmunodeficiencias primarias o adquiridas, tratamientos con antibióticos de amplio espectro, fármacos antineoplásicos e inmunosupresores,

trasplantes de órganos sólidos y médula ósea, alimentación parenteral, empleo de catéteres intravenosos, procedimientos para aumentar la supervivencia de neonatos pretérmino y la prolongada permanencia en unidades de cuidados intensivos (UCI), entre otras causas (Godoy *et al.*, 2003; Mendoza, 2005; Mesa *et al.*, 2005; Sánchez, 2006; Zaragoza y Pemán, 2006; Duarte *et al.*, 2009).

Las especies del género *Candida* que se aíslan con mayor frecuencia son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*, pero esta frecuencia puede variar según el centro hospitalario y las distintas unidades médicas del mismo, e incluso según el país, la región y hasta de un año a otro. Aunque *C. albicans* es la especie más aislada, se está observando una disminución en su frecuencia, debido al incremento de especies no-*albicans* en todo el mundo (Khlif *et al.*, 2008).

En Estados Unidos, la tasa de aislamientos de *C. albicans* disminuyó del 87,0% en 1982 al 54,0% en 1998. *C. parapsilosis* pasó del segundo lugar (9,0%) en 1987 a el tercero (15,0%) en 1998, ocupando el segundo puesto *C. glabrata* (21,8%); este incremento está relacionado con el empleo de fluconazol, como profilaxis antifúngica, al que esta especie presenta resistencia primaria. Dado los diferentes hábitats y los distintos factores de virulencia que desarrollan, las diversas especies de *Candida*, poseen características epidemiológicas propias (Sanduen, 2000; Cantón *et al.*, 2001).

C. albicans, sigue siendo la especie que se aísla con mayor frecuencia en muestras clínicas; sin embargo, desde 1995, se ha descrito una nueva especie llamada *Candida dubliniensis*, que presenta características fenotípicas similares a *C. albicans*, incluyendo la capacidad de producir tubos germinales y clamidoconidias, lo cual dificulta su identificación en el laboratorio clínico; por tal motivo, una gran variedad de métodos han sido desarrollados para distinguirlos,

los cuales varían en tiempo, especificidad, sensibilidad, costos, entre otros. De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad. Entre estos métodos tenemos: la sensibilidad al estrés (temperatura, salinidad), crecimiento en medios específicos (CHROMagar), asimilación y fermentación de carbohidratos (maltosa, sacarosa, galactosa, celobiosa, xilosa y lactosa), sistemas comerciales estandarizados (API ID 32 C); y a pesar de que ambas especies producen clamidoconidias, algunos autores señalan que *C. dubliniensis* produce en mayor cantidad y en disposiciones diferentes que *C. albicans* (Schoofs *et al.*, 1997). No obstante, estos métodos pueden no ser fiables, por ello, es fundamental emplear métodos de caracterización molecular que, a pesar de ser complejos para el uso rutinario en el laboratorio, proporcionan una identificación más específica (Dolapci *et al.*, 2002; Anane *et al.*, 2007; Khlif *et al.*, 2008).

La epidemiología molecular de *C. dubliniensis* se ha estudiado a partir de sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN), empleando el método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se han llegado a utilizar análisis de PCR directo o multiplex PCR con cebadores específicos que amplifican los genes proteasa aspártica secretada (SAP) y dipéptidil aminopéptidasa (DAP2), permitiendo diferenciar claramente *C. albicans* de *C. dubliniensis*, con esto se ha evidenciado la existencia de distintos genotipos entre estas dos especies (Wahyuningsih *et al.*, 2000; McCullough *et al.*, 2009).

Estudios realizados en Estados Unidos, con pacientes pediátricos con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), permitieron confirmar genéticamente, mediante cariotipo electroforético, la presencia de *C. dubliniensis* en la cavidad oral de dichos pacientes (Brown *et al.*, 2000). Por otra parte, en Argentina, pruebas realizadas en fluidos subgingival de individuos inmunocompetentes con enfermedad periodontal, permitieron comparar ensayos fenotípicos y moleculares en los cuales se observó el pequeño límite de diferencia entre

ambas especies, fenotípicamente solo se pudo obtener una identificación presuntiva de *C. dubliniensis*, mientras que con la caracterización molecular, a través del método de PCR, se llegó a su identificación definitiva (Jewtuchowicz *et al.*, 2008). Otro estudio, realizado en Brasil por Mello, en el año 2009, donde se evaluó la microbiota fúngica en pacientes pediátricos con anemia falciforme, se diferenció *C. dubliniensis* de *C. albicans* empleando los cebadores DUBR y DUBF, los cuales son específicos para esta especie, siguiendo la metodología propuesta por Donnelly *et al.*, 1999.

Candida dubliniensis, está distribuida a nivel mundial y se relaciona principalmente con la candidosis oral en pacientes infectados por el VIH (1,5-32,0%). En pacientes sanos está generalmente ausente, pero según un estudio realizado en Sudáfrica, 14,0% de los caucásicos presentaban *C. dubliniensis* en la cavidad oral; sin embargo, se han realizado estudios donde señalan la presencia de *C. dubliniensis* en otros tipos de muestras clínicas, que incluyen hemocultivos, secreciones vaginales, heces, en enfermos con o sin infección por VIH y en pulmones, y frecuentemente causando de fatales infecciones sistémicas. 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 es en la cavidad oral y el tracto respiratorio superior (Tintelnot *et al.*, 2000; Blignaut *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2005).

Debido al incremento en la prevalencia de las micosis, se ha hecho necesario desarrollar sustancias antifúngicas para tratar estas infecciones. Las primeras fueron los polienos y la fluorocitina, luego los imidazoles, posteriormente los triazoles y recientemente las equinocandinas, sordarinas y azoles de última generación. Con el desarrollo de los triazoles, específicamente fluconazol e itraconazol, se inició la profilaxis antifúngica y la terapia empírica en pacientes inmunodeprimidos con sospecha clínica de micosis; trayendo como

consecuencia, cambios epidemiológicos, como la aparición de cepas con resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de especies sensibles por otras con resistencia intrínseca (Zaragoza y Pemán, 2006). Por otra parte, estudios preliminares indican que la mayoría de las cepas de *C. dubliniensis* son susceptibles a los agentes antifúngicos; sin embargo, se han realizado estudios donde se demuestra que *C. dubliniensis* desarrolla resistencia *in vitro* al fluconazol (Gutierrez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002; Chunchanur *et al.*, 2009).

En Venezuela, al igual que en otros países, son pocos los casos reportados sobre enfermedades producidas por *C. dubliniensis* (Mata *et al.*, 2002; Mesa *et al.*, 2004; Hartung *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2006). Debido a la falta de conocimiento, experiencia, procedimientos estandarizados y por su gran semejanza con *C. albicans*, no se han podido establecer diagnósticos correctos de candidosis producidas por esta especie. En este sentido, la PCR contribuye al conocimiento epidemiológico de la frecuencia de infecciones por *C. dubliniensis* y la distribución de la misma en la población, de tal manera que se puedan implementar y aplicar planes terapéuticos adecuados.

Por tal motivo, el objetivo general de esta investigación consistió en identificar *C. dubliniensis*, fenotípica y molecularmente, en muestras de pacientes hospitalizados y ambulatorios con candidosis, provenientes de diferentes centros de salud en la ciudad de Cumaná, estado Sucre; con la finalidad de que los laboratorios clínicos puedan contar con las pruebas fenotípicas básicas que les permitan obtener una identificación rápida y definitiva de esta especie.

METODOLOGÍA

MUESTRA POBLACIONAL

Se recolectaron muestras clínicas de la mucosa oral (36), secreción vaginal (40), orina (49) y heces (86) de pacientes con diagnóstico clínico de candidosis, de diferentes edades y ambos sexos, ambulatorios y hospitalizados provenientes del hospital tipo I “Salvador Allende”, hospital “Dr. Julio Rodríguez”, Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” y el Ambulatorio “Dr. Ramón Martínez” de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. El muestreo se realizó entre los meses de febrero a junio de 2010.

A cada paciente se le realizó una encuesta epidemiológica y clínica y un consentimiento o permiso del representante, en caso de tratarse de menores de edad, siguiendo los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki, entre los cuales destacan: este trabajo de investigación estuvo a cargo de personas con la debida preparación científica y bajo vigilancia de profesionales de la salud, por otra parte, se respetó el derecho de cada individuo participante en la investigación de salvaguardar su integridad personal y se adoptaron las precauciones necesarias para respetar la intimidad, integridad física y mental del sujeto (OPS, 2001).

TOMA DE MUESTRA

Se eligió la muestra más adecuada según la impresión diagnóstica del paciente. Igualmente, se cumplieron las normas de asepsia y las recomendaciones de acuerdo al tipo de muestra tomada (Koneman *et al.*, 1999).

Orina: se recolectó la parte media de la micción matinal, en un recipiente estéril, un volumen no menor a 10 ml hasta 20 ml, previa limpieza de sus genitales con agua y jabón. La muestra se conservó en nevera (4°C), en los

casos que no se pudo procesar antes de las dos horas reglamentarias, para inhibir el sobrecrecimiento de bacterias que se desarrollan con rapidez.

Heces: las muestras de materia fecal diarreicas, se tomaron en recipientes de boca ancha nuevos (no necesariamente estériles), con tapa hermética. La muestra se transportó al laboratorio, en un periodo máximo de 2 horas, para procesarse inmediatamente, en su defecto, se conservó en la nevera a 4°C.

Secreción vaginal: Se tomaron dos muestras del fondo de saco vaginal con hisopos estériles y se colocaron en dos tubos que contenían 2 ml de solución salina fisiológica estéril (uno para examen directo y otro para el cultivo), para esto, se contó con la ayuda de un médico ginecólogo. Se excluyeron del estudio a las pacientes con tratamiento antimicótico aplicado en los últimos 7 días (anteriores a la toma de muestra), las que hicieron uso de duchas vaginales previamente a la consulta y las pacientes que hubieran tenido relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.

Secreción orofaríngea: se tomó una muestra de lesiones blanquecinas presentes en la cavidad oral de pacientes VIH positivo con un hisopo estéril, éste se colocó en un tubo que contenía 2 ml de solución salina fisiológica estéril, para ser procesada en un tiempo no mayor de 24 horas.

EXAMEN DIRECTO

Una vez tomada la muestra se procedió a realizar un examen en fresco entre lámina y laminilla con hidróxido de potasio (KOH) al 10,0%, lugol y tinción de Gram, con el fin de visualizar: blastoconidias (cantidad, morfología y tamaño), número de gemaciones, pseudohifas y/o hifas y tipo de células presentes (células epiteliales, leucocitos, macrófagos, etc).

Se empleó KOH al 10,0% para disolver rápidamente las células permitiendo

digerir material proteico en muestras de exudados vaginales y secreciones, favoreciendo la observación de los elementos fúngicos (Figura 1). Adicionalmente, se empleo lugol para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización (Koneman *et al.*, 1999).

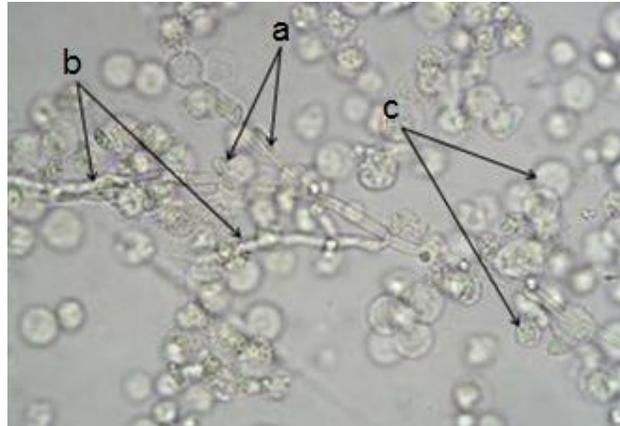


Figura 1. Examen al fresco con hidróxido de potasio (40X): a) blastoconidias; b) pseudohifas; c) leucocitos.

Se utilizó la coloración de Gram para observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida* (figura 2). Las cuales son Gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración (Murray *et al.*, 2003).

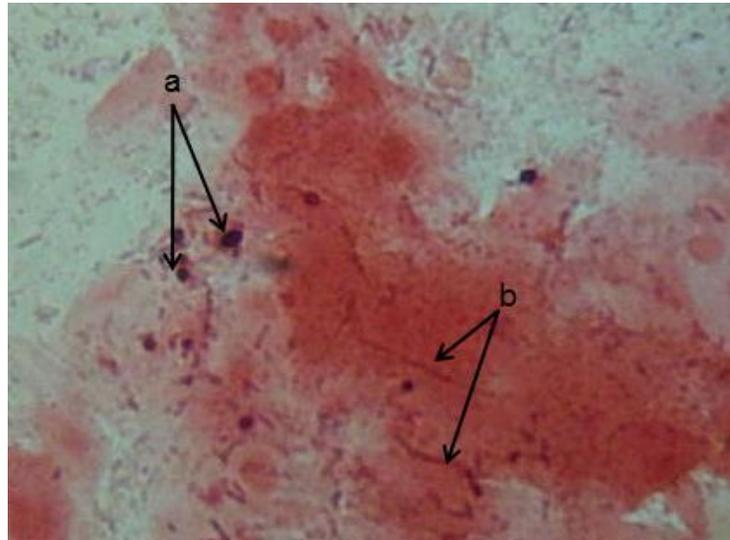


Figura 2. Examen al fresco con tinción de Gram (100X): a levaduras, teñidas como estructuras Gram positivas); b) pseudohifas.

CULTIVO

Se sembró la muestra en los medios de cultivos habituales para el aislamiento de hongos levaduriformes, de la siguiente manera (Koneman *et al.*, 1999):

Orina: se inoculó 50 µl de orina centrifugada a 3500 rpm por 5min, en dos tubos que contenían agar Sabouraud dextrosa (ASD). Se incubaron de 30-35°C por 48-72 horas, hasta obtener crecimiento.

Secreción vaginal: las muestras se sembraron por duplicado en ASD con antibiótico (cloranfenicol al 1,0%) y en agar Mycosel[®]. Posteriormente fueron incubadas de 30-35°C por 48-72 horas, hasta obtener crecimiento.

Heces: las muestras se sembraron en una placa con agar Fungobiotic y posteriormente se incubaron a 30°C durante 24-48 horas, hasta obtener crecimiento.

Secreción orofaríngea: las muestras se sembraron en una placa con ASD. Posteriormente se incubaron de 30-35°C durante 48-72 horas, hasta observar desarrollo.

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*

Se realizó un procedimiento integrado por las características morfológicas de las colonias que se obtuvieron del cultivo y una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas, necesarias para identificar el género y la especie de las levaduras aisladas.

Características morfológicas

Macroscópicas: se observó el aspecto de las colonias en ASD, (circulares, lisas, blancas, cremosas, de bordes precisos y centro ligeramente prominente) característico de levaduras del género *Candida* (figura 3).

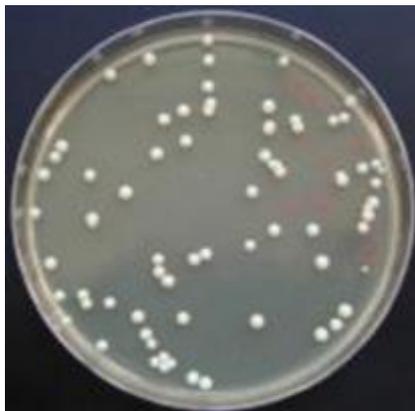


Figura 3. Colonias de *Candida albicans* en agar Sabouraud dextrosa

Microscópicas: se observó la disposición de las blastoconidias y formación de pseudomicelio, característicos para cada especie de *Candida* en medio sólido. Para ello se usó el método de Dalmau, que consistió en sembrar por estrías, una porción de la colonia aislada, en placas con el medio Corn Meal Agar (CMA) y se le colocó encima una laminilla cubreobjeto; posteriormente, se incubó a 28°C por 24 a 48 horas (figura 4) y luego se observó en el microscopio la morfología de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (figura 5); las cuales producen pseudohifas ramificadas con blastoconidios de tamaño regular redondos y gemantes, de paredes lisas, dispuestos en acúmulo o racimos en los puntos de constricción de la pseudohifa; pueden o no estar presentes las clamidoconidias

características de estas especies (Kurtzman y Fell, 1998).



Figura 4. Técnica de Dalmau en placa con Corn Meal agar.

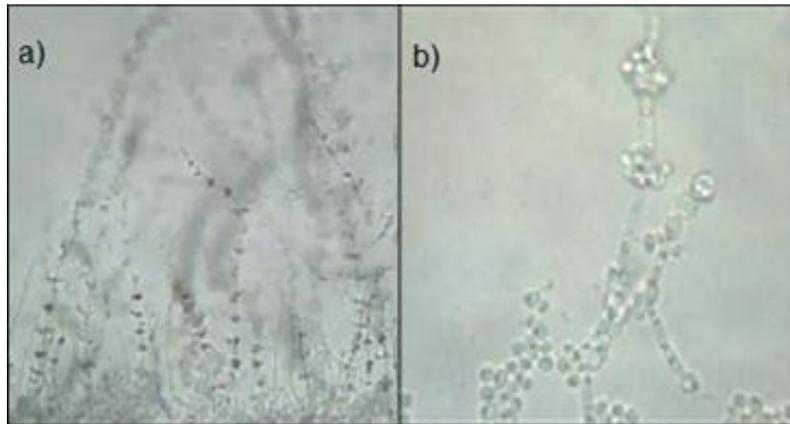


Figura 5. Cultivo de *Candida dubliniensis* en Corn Meal agar por la técnica de Dalmau, mostrando agrupamientos de blastoconidios dispuestos entre células de pseudohifas adyacentes: a) 10X; b) 40X.

Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Producción de tubo germinal o filamentización en suero: se colocó una pequeña porción de una colonia, obtenida de un cultivo de 24 horas, en 0,5 ml de suero y se incubó a 37°C por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se colocó una gota de la suspensión entre lámina y laminilla y se observó al microscopio (40X). Esta prueba es positiva tanto para *C. albicans* como para *C. dubliniensis*, quienes producen un tubo fino y continuo, sin constricción en el lugar de origen (figura 6) (Cuétara *et al.*, 2006).

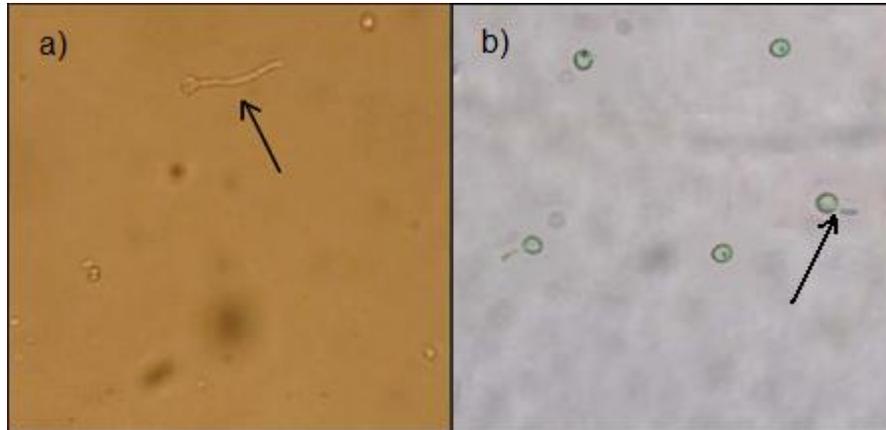


Figura 6. Prueba de filamentización en suero humano a 37°C: a) tubo germinal de *C. albicans* (40X); b) tubo germinal de *C. dubliniensis* (40X).

Producción de clamidoconidias:

Para obtener estas estructuras de resistencia, característica de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, se utilizaron placas con el medio CMA, las cuales se inocularon, por estría, con una pequeña porción de la colonia de cada levadura, luego se colocó encima una lámina cubreobjeto y se incubaron las placas a 28°C durante 24-48 horas, transcurrido este tiempo se observó al microscopio la morfología característica de la especie (figura 7) (Pardi *et al.*, 2003).

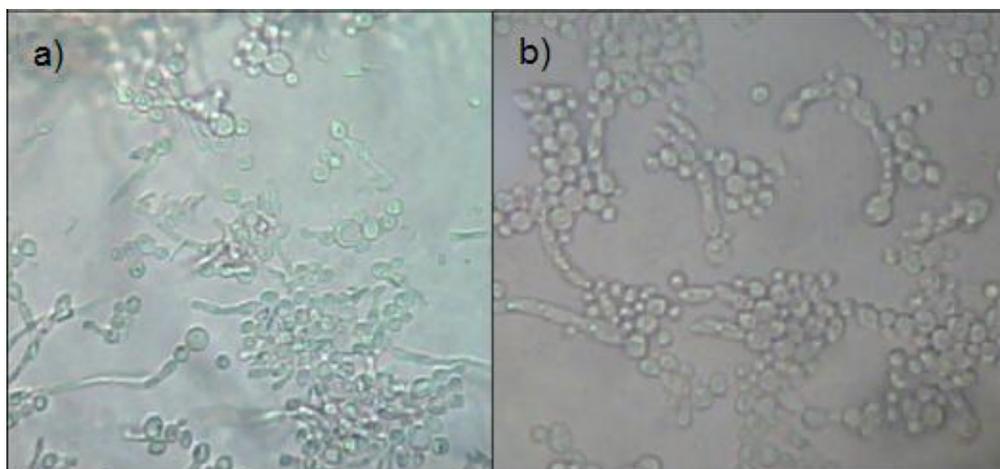


Figura 7. Producción de clamidoconidias: a) *C. albicans* (40X); b) *C. dubliniensis* (40X).

Producción de color en medio cromogénico:

Para ello se empleó el medio Chromatic *Candida*, la siembra se realizó según técnicas convencionales y se incubó a 37°C durante 48 horas, para que las levaduras desarrollaran el color que las caracteriza. El fundamento de la técnica se basa en la detección de actividades enzimáticas, por parte de las levaduras, mediante la hidrólisis específica de un substrato cromogénico en presencia de un indicador. Se pueden identificar 4 especies con una alta confiabilidad por el color de la colonia: *C. tropicalis* produce colonias lisas, cremosas, de color azul intenso o colonias verde azuladas oscuras y ambas con tono metálico; *C. krusei* produce colonias de color rosa pálido, de aspecto veloso o ligeramente aterciopelado, opaco o seco y de superficie plana; *C. albicans* y *C. dubliniensis* producen colonias de color verde esmeralda, brillantes, lisas y cremosas (figura 8) (Koehler *et al.*, 1999).

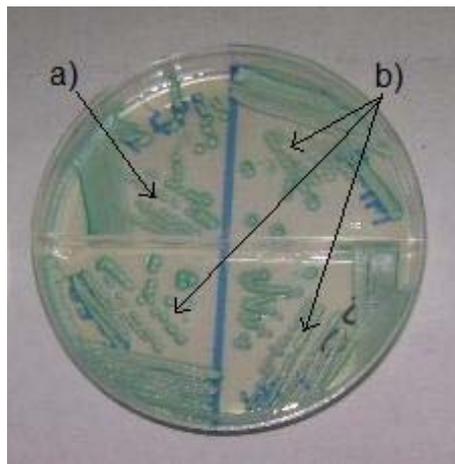


Figura 8. Placas con medio Chromatic *Candida*. Aislamientos de presuntivas: a) *C. dubliniensis* y b) *C. albicans*.

Prueba de crecimiento en cloruro de sodio (NaCl) al 6,5%: se preparó una suspensión de la levadura sospechosa a 0,5 McFarland y se agregaron 25 µl de

esta suspensión a un tubo de ensayo con 1 ml de NaCl al 6,5% y una gota de extracto de levadura al 10,0%; posteriormente, se incubó el tubo a 37°C por un máximo de 72 horas. Al término de este tiempo, las cepas de *C. albicans* produjeron turbidez y crecimiento en el tubo; por el contrario, *C. dubliniensis* no creció ni produjo turbidez en NaCl al 6,5% (Hartz *et al.*, 2002).

Prueba de termotolerancia: las colonias se sembraron en ASD y se incubaron a temperaturas de 42 y 45°C durante 72 horas. *C. dubliniensis*, no crece a temperaturas mayores de 37°C (Pinjon *et al.*, 1998).

Fermentación de azúcares (zimograma): se fundamenta en la propiedad que tienen las levaduras de utilizar los azúcares en anaerobiosis, lo cual se evidencia por la producción de gas. Para esta prueba se utilizaron los siguientes azúcares: glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa en concentración al 2,0% y rafinosa al 4,0%, los cuales se prepararon en medio basal de peptona mezclado con extracto de levadura al 1,0%. La formación de dióxido de carbono (CO₂) se detectó incorporando al medio líquido un tubo de Durham invertido. La observación se realizó diariamente, debido a que el gas se puede reabsorber. Para inocular las cepas se preparó una suspensión de la levadura aislada (con una turbidez igual al patrón N° 4 de la escala McFarland), luego se añadieron 3 gotas de esta suspensión a los tubos que contenían los azúcares antes mencionados con el tubo de Durham invertido, se agitaron suavemente e incubaron a 28°C durante 3-5 días (Lasker *et al.*, 2001).

Lectura e interpretación: Se consideró la prueba de fermentación positiva al obtenerse formación de CO₂ dentro del tubo de Durham invertido (figura 9). Los resultados se interpretaron según la tabla de identificación de levaduras (anexo 1).

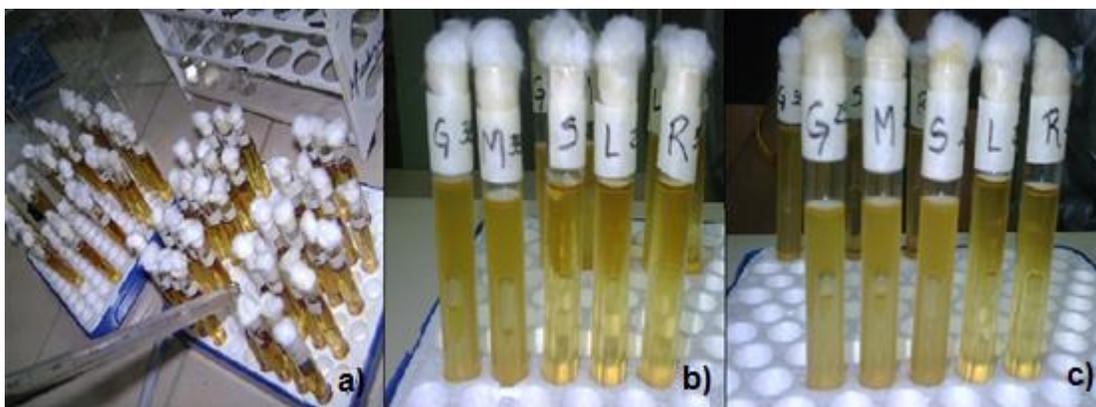


Figura 9. Prueba de fermentación de azúcares (zimograma): a) preparación de medios; b) *C. albicans*; c) *C. dubliniensis*.

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFICACIA DE LAS PRUEBAS FENOTÍPICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *C. DUBLINIENSIS*.

Para ello se utilizó la PCR como método de referencia, y los parámetros verticales (sensibilidad y especificidad), parámetros horizontales (valor predictivo positivos y valor predictivo negativos) y además, la eficacia (parámetro diagonal) que se interpreta como el porcentaje del total de resultados correctos (Mazziotta y Fernández, 2005):

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} * 100$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} * 100$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}} * 100$$

$$\text{Eficacia} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{(\text{VP} + \text{FP} + \text{FN} + \text{VN})} * 100$$

Donde:

VP= verdaderos positivos.

VN= verdaderos negativos.

FP= falsos positivos.

FN= falsos negativos.

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS (AZOLES)

Método de difusión en agar con discos de antifúngicos (antifungigrama): este método se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por el Comité Internacional de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), 2008, en su documento M44-A, para la determinación de susceptibilidad de hongos levaduriformes a los antifúngicos;

Técnica:

A partir de un cultivo de 24 horas a 35°C en ASD, se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland (siguiendo las indicaciones establecidas en el manual M44-A para un estricto control de calidad) en solución salina fisiológica (SSF) estéril. Para el método de difusión se utilizaron placas de Petri de 10 cm de diámetro, con 25 ml de agar Mueller-Hinton modificado (MHm), adicionado con 2,0% de glucosa y con el agregado de azul de metileno, en una concentración final de 0,5 mg/ml.

La superficie de cada placa de Petri, con agar MHm, se diseminó en tres direcciones con un hisopo cargado con el inóculo correspondiente,

posteriormente, se dejaron secar durante 10 a 15 minutos en estufa, a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se colocó un disco de fluconazol (25 μg), un disco de voriconazol (1 μg) y un disco de itraconazol (1 μg) por placa y luego se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C , la prueba se realizó por duplicado. Pasado el tiempo de incubación, se midió, con una regla milimetrada, el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento y se catalogó como sensible o resistente, empleando los puntos de corte recomendados para levaduras por el CLSI (2008)

Cepas de referencia

Para el control de calidad, se utilizaron las cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas por el CLSI: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, donadas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, Caracas, Venezuela.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Descripción de la muestra: para el presente estudio se utilizaron las cepas, presuntivas de *C. albicans*, aisladas en las diferentes muestras de la población de estudio e identificadas por métodos micológicos convencionales, descritos anteriormente.

Extracción del ADN: Las diferentes cepas, identificadas por métodos micológicos como presuntivas *C. albicans*, fueron cultivadas en ASD por 48 horas a 28°C . Se recolectaron las colonias añadiendo al cultivo 1 ml de amortiguador Tris-ácido etilendiaminotetraacético (TE) pH 8,0 (10 mmol/l Tris-ácido clorhídrico; 1,0 mmol/l ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugó el homogenato a 14 000 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el sedimento fue resuspendido en 200 μl de amortiguador TE a pH 8,0. Se procedió a la ruptura térmica de las células obtenidas (aproximadamente 3-4 x

10⁹ UFC/ml), mediante 3 ciclos de congelar-descongelar (-70°C/30 min y 100°C/10 min). Luego de centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se guardó el sobrenadante a -20°C hasta su posterior uso para la PCR (Brena *et al.*, 2003).

Selección de los cebadores: Se utilizaron los cebadores DUBF (5'-GTATTTGTCGTTCCCCTTTC-3') y DUBR (5'TGTTGTGTGCACTAACGTC-3') descritos por Donnelly *et al.* (1999), que fueron diseñados basándose en las diferencias observadas en la secuencia nucleotídica de las regiones ITS1 e ITS2 de cepas pertenecientes a *C. dubliniensis*. La pareja de iniciadores presenta una base desapareada en el extremo 3' para incrementar la especificidad en la reacción y se utilizaron para amplificar por separado un fragmento de aproximadamente 288 pares de bases (pb).

Técnica de PCR: Se siguió el protocolo propuesto por Brena *et al.* (2003), con modificaciones. La mezcla para cada reacción de PCR fue preparada con 2,00 µl de ADN para cada ensayo, 1,00 µl de amortiguador 10X de PCR (200 mmol/l Tris- ácido clorhídrico, pH 8,4; 500 mmol/l cloruro de potasio), 0,20 mmol/l de cada nucleótido trifosfato (dNTPs), 0,20 µmol/l de cada cebador, 1,50 mmol/l de cloruro de magnesio (MgCl₂) y 1,25 UI/µl de *Thermus aquaticus* (*Taq*) polimerasa (Promega). Además se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) como adyuvante. La adición del DMSO permitió separar estructuras secundarias ricas en guanina-citosina (G-C) durante los últimos ciclos de la reacción de PCR. Todas las muestras fueron corridas en un termociclador marca Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer®, utilizando el siguiente programa: 10 ciclos con una temperatura de hibridación inicial de 65°C, disminuyendo 1°C cada ciclo; seguido de 30 ciclos con una temperatura de hibridación estable a 55°C.

Visualización de los amplicones: los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio

(BrEt), cuya concentración en el gel fue de 0,5 µg/ml. La corrida se realizó a 75 V por 45 minutos en una solución amortiguadora 0,045 mol/l Tris-Borato 0,001 mol/l EDTA (TBE) con pH de 8,3.

Controles

Para la optimización de la PCR se utilizó ADN de 2 cepas controles; una para *C. albicans* (ATCC 90028) y otra para *C. dubliniensis* (J930822a), provenientes del instituto nacional de higiene “Rafael Rangel” (INHRR), las cuales fueron mantenidas en ASD a 4°C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la aplicación de estadísticas descriptivas y representados en tablas y figuras. Se aplicó la prueba estadística de Chi-cuadrado con un 95,0% de confiabilidad, para determinar el grado de asociación entre los factores clínicos y epidemiológico de los pacientes y el aislamiento de *C. dubliniensis* (Jiménez, 2000). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15,0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA).

RESULTADOS

El presente estudio representa el primer trabajo de identificación de *C. dubliniensis* realizado en la ciudad de Cumaná, en el estado Sucre. Para ello se analizaron un total de 211 muestras (86 heces, 49 orinas, 36 secreciones orofaríngeas y 40 secreciones vaginales), obtenidas de pacientes de diferentes grupos etarios y ambos sexos, provenientes de distintos centros de salud de la ciudad. Del total de muestras procesadas, se obtuvieron 145 (69,0%) cultivos positivos para levaduras del género *Candida*, correspondiendo el mayor porcentaje a pacientes ambulatorios (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de cultivos positivos para *Candida* en muestras de pacientes hospitalizados y ambulatorios provenientes de diferentes centros de salud de Cumaná, estado Sucre. Febrero – Junio de 2010.

Muestra	Nº	Cultivos positivos				Cultivos negativos	
		Hospitalizados		Ambulatorios		n	%
		n	%	n	%		
Heces	86	0	0,0	63	73,3	23	26,7
Orina	49	0	0,0	42	85,7	7	14,3
Secreción orofaríngea	36	11	30,6	16	44,4	9	25,0
Secreción vaginal	40	0	0,0	13	32,5	27	67,5
Total	211	11	5,2	134	63,5	66	31,3

Nº: número de muestras; n: número de cultivos; %: porcentaje

De los cultivos positivos se aislaron 51 (30,0%) cepas de levaduras identificadas fenotípicamente como presuntivas *C. albicans*, mediante pruebas convencionales rápidas aplicadas en el laboratorio, tales como, formación de tubo germinal, producción de clamidoconidias, morfología característica (técnica de Dalmau) y producción de colonias verdes en agar CROMATIC *Candida*. Adicionalmente, se aislaron 6 (4,0%) cepas que produjeron color verde en agar cromogénico pero que no crecieron a 45°C ni en medio con NaCl al 6,5%, identificándose fenotípicamente como presuntivas *C. dubliniensis*; las mismas fueron aisladas casi en su totalidad (66,7%) de pacientes

ambulatorios, lo cual se expresa de forma grafica en la figura 10.

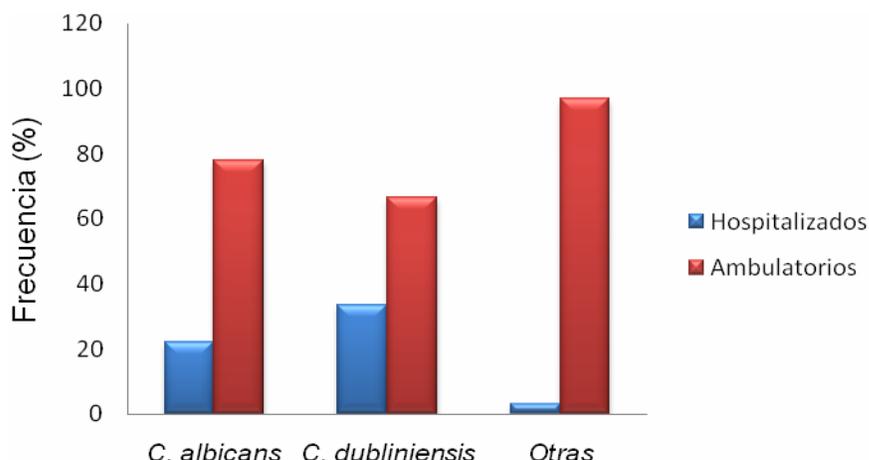


Figura 10. Frecuencia de especies presuntivas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* identificadas mediante métodos convencionales, según la procedencia de la muestra.

Se ha dicho, que las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis* son fenotípicamente similares. En este estudio, para llegar a una identificación presuntiva de ambas especies, se establecieron 6 perfiles fenotípicos los cuales son observados en la tabla 2, basados en la formación de tubo germinal, producción de clamidoconidias, fermentación de carbohidratos, crecimiento a 45°C y desarrollo en NaCl al 6,5%.

Tabla 2. Perfil fenotípico expresado en 51 cepas aisladas de diferentes tipos de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios en diferentes centros de salud de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.

Grupo	N°	TG	FC	Crec. 45°C	NaCl 6,5%	zimograma				Especie presuntiva
						G	L	M	R	
I	1	+	+(abte)	+	-	+	-	+	-	<i>C. dubliniensis</i>
II	3	+	+(abte)	-	-	+	-	+	-	<i>C. dubliniensis</i>
III	41	+	+(esc)	+	+	+	-	+	-	<i>C. albicans</i>
IV	2	+	+(esc)	+	-	+	-	+	-	<i>C. dubliniensis</i>
V	2	+	+(esc)	+	+	+	-	+	-	<i>C. albicans</i>
VI	2	+	+(esc)	+	+(deb)	+	-	+	-	<i>C. albicans</i>

N°: número de cepas; TG: tubo germinativo; FC: formación de clamidoconidias; esc: escasa formación; deb: reacción débil; abte: formación abundante; Crec.: crecimiento; G: glucosa; L: lactosa; M: maltosa; R: rafinosa.

En la tabla 2, se pudo observar una diferencia en los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento a 45°C y desarrollo en NaCl al 6,5%, donde las cepas positivas para estas pruebas fueron identificadas como *C. albicans* y las negativas como *C. dubliniensis*. Basado en esto se pudo decir que los grupos III, V y VI, corresponden con un perfil fenotípico de *C. albicans* y los grupos I, II y IV al perfil de *C. dubliniensis*.

La validez de una prueba tiene tres aspectos importantes; sensibilidad, especificidad y eficacia, donde la confiabilidad de los resultados emitidos van a estar dados por estos valores. A continuación, en la tabla 3, se muestran los porcentajes de estos aspectos, calculados a cada una de las pruebas fenotípicas aplicadas en este estudio, para lograr la diferenciación entre *C. albicans* de *C. dubliniensis*, con el propósito de establecer un esquema de identificación confiable que permita identificar correctamente *C. dubliniensis*. Los resultados arrojados confirmaron que la prueba de crecimiento en NaCl al 6,5%, tiene un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad para la identificación fenotípica de dicha especie, permitiendo así diferenciarla de *C. albicans*.

Tabla 3. Porcentaje de sensibilidad, especificidad y eficacia de las pruebas fenotípicas para la identificación de *C. dubliniensis* en los diferentes tipos de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.

Pruebas	VPP %	VPN %	S %	E %	Eficacia %
Produc. de tubo germinativo	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Formac. de clamidoconidias	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Crecimiento a 45°C	93,8	100,0	100,0	50,0	94,1
NaCl 6,5%	97,8	83,3	97,8	83,3	96,1
Fermentación de carbohidratos:					
Glucosa	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Lactosa	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Maltosa	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Rafinosa	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; S: sensibilidad; E: especificidad; %: porcentaje; NaCl: cloruro de sodio.

Estandarización de la técnica de PCR: A fin de determinar la concentración óptima de reactivos para la obtención de una amplificación adecuada del producto de 288 pb del gen específico para *C. dubliniensis*, fue necesario realizar varias PCR. Se inició con las concentraciones de reactivos propuestas por Brena *et al.* (2003). Debido a que la amplificación no se logró bajo estas condiciones, fue necesario modificar las temperaturas y los tiempos en el termociclador, así como la realización de variaciones en la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂).

Las distintas condiciones ensayadas en cuanto a concentración de reactivos se aprecian en la tabla 4. Las variaciones con respecto al protocolo de amplificación fueron dirigidas a cambios en la temperatura de hibridación de los iniciadores con el fin de obtener un acoplamiento adecuado a la secuencia diana, así como la óptima polimerización del ADN. Los resultados no fueron óptimos, por lo que se procedió a utilizar una variación en la concentración de reactivos, las cuales se indican en la mencionada tabla.

Tabla 4. Resultados de pruebas realizadas para la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivos	Pruebas ensayadas					
	1	2	3	4	5	6
Amortiguador 10X (μl)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Nucleótido trifosfato (mmol/l)	0,40	0,40	0,20	0,20	0,20	0,20
MgCl ₂ (mmol/l)	1,50	1,50	2,00	1,20	2,50	1,50
DMSO (%)	-	-	-	0,10	0,15	0,25
<i>Taq</i> polimerasa (UI/μl)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Cebadores DUBF/DUBR (μmol/l)	0,40	0,40	0,40	0,20	0,20	0,20

MgCl₂: cloruro de magnesio; DMSO: dimetilsulfoxido; *Taq*: *Thermus aquaticus*.

Al evaluar el producto en geles de agarosa al 2,0%, se observó una banda bien definida de aproximadamente 288 pb, en 5 de las cepas identificadas por el análisis micológico (figura 11).

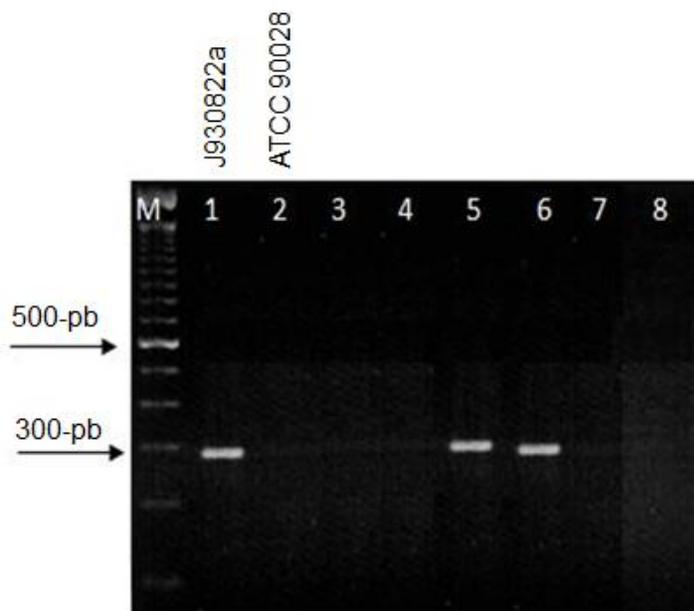


Figura 11. Productos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa, en gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/ml), con cebadores DUBR/DUBF, que amplifica un fragmento específico para *C. dubliniensis* de 288 pb. M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1 y 2: cepas control; 3, 4, 7 y 8: muestras negativas. 5 y 6: muestras positivas.

Los resultados obtenidos de los productos amplificados con la estandarización de la PCR especie específica para *C. dubliniensis*, de las cepas estudiadas, lograron establecer una diferenciación entre éstas y *C. albicans*.

Al comparar los 6 perfiles fenotípicos, anteriormente establecidos, con los resultados de la PCR especie específica para *C. dubliniensis*, con el propósito de visualizar si cada perfil se corresponde con la especie obtenida en dicha prueba molecular, se pudo observar que todos los aislados pertenecientes al grupo III y V fueron confirmados como *C. albicans*, y todos los aislados de los grupos I y II como *C. dubliniensis*, por el método molecular empleado; sin embargo, las cepas pertenecientes al grupo IV, a pesar de haber sido identificadas fenotípicamente como *C. dubliniensis*, sólo una (1) fue confirmada genotípicamente; y de las cepas pertenecientes al grupo VI, identificadas fenotípicamente como *C. albicans*, una (1) resultó positiva para *C. dubliniensis* por PCR (tabla 5).

Tabla 5. Relación de los grupos fenotípicos con los resultados de la reacción en cadena polimerasa especie específica para *C. dubliniensis* de las cepas aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios en Cumaná, estado Sucre. Febrero–junio de 2010.

Grupo	n	Especie presuntiva	PCR DUBR/DUBF	
			Positiva	Negativa
I	1	<i>C. dubliniensis</i>	1	0
II	3	<i>C. dubliniensis</i>	3	0
III	41	<i>C. albicans</i>	0	41
IV	2	<i>C. dubliniensis</i>	1	1
V	2	<i>C. albicans</i>	0	2
VI	2	<i>C. albicans</i>	1	1

n: número de cepas; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En la actualidad, fluconazol, itraconazol y voriconazol son tres potentes antifúngicos (azoles) que poseen una amplia eficacia contra la mayoría de las levaduras patógenas, incluyendo *C. albicans* y *C. dubliniensis*; está

comprobado que esta última tiende a presentar resistencia a azoles en algunos casos. En la tabla 6 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad antifúngica de *C. albicans* y *C. dubliniensis* a fluconazol, itraconazol y voriconazol, donde se pudo evidenciar que la mayoría de las cepas de *C. dubliniensis* desarrollaron resistencia *in vitro* a estos antifúngicos (figura 12).

Tabla 6. Resultados de las pruebas de sensibilidad a fluconazol, itraconazol y voriconazol, utilizando el método de difusión en agar en cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* provenientes de diferentes tipos de muestras en pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.

Antimicóticos	<i>C. albicans</i>				<i>C. dubliniensis</i>			
	Sensible		Resistente		Sensible		Resistente	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fluconazol	42	93,3	3	6,7	2	33,3	4	66,7
Itraconazol	43	95,6	2	4,4	2	33,3	4	66,7
voriconazol	30	66,7	15	33,3	2	33,3	4	66,7

n: número de cepas; %: porcentaje

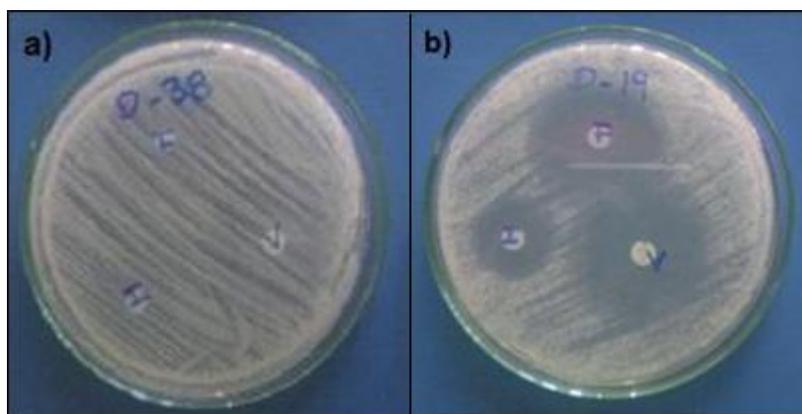


Figura 12. Susceptibilidad a azoles (fluconazol, voriconazol e itraconazol): a) *C. dubliniensis*; b) *C. albicans*

Se sabe que *C. dubliniensis* se ha aislado con mayor frecuencia de la cavidad oral de pacientes inmunosuprimidos, aspecto que se puede evidenciar en la

tabla 7, donde se muestran las cepas aisladas en los diferentes tipos de muestras analizadas, observándose que el mayor porcentaje de aislamiento de *C. dubliniensis* se obtuvo en muestras de secreción orofaríngea de pacientes infectados con VIH, y un aislado proveniente de una muestra de orina de un paciente con hipertensión.

Tabla 7. Distribución porcentual de las cepas aisladas según el tipo de muestras, provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.

Muestra	N°	Cepas aisladas						Total de cepas
		<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		otras		
		n	%	n	%	n	%	
Heces	86	6	9,5	0	0,0	57	90,5	63
Orina	49	10	23,2	1	2,3	32	74,4	43
SOF	36	23	74,2	5	16,1	3	9,7	31
SV	40	6	46,2	0	0,0	7	53,8	13
total	211	45	30,0	6	4,0	99	66,0	150

N°: número de muestras; SOF: secreciones orofaríngea; SV: secreciones vaginales; %: porcentaje; n: número de cepa.

Para este estudio se tomaron diferentes tipos de muestras (orinas, heces, secreciones vaginales, secreciones orofaríngeas) provenientes de pacientes ambulatorios y hospitalarios, de diferentes edades y sexo, de las cuales se lograron aislar 6 cepas de *C. dubliniensis*, a estas se les asignó un código de manera aleatoria. En la tabla 8 se muestran los datos epidemiológicos de los pacientes a los cuales se les aisló *C. dubliniensis*, así como el tipo de muestra y la procedencia, donde se observa que dicha especie fue aislada mayormente de secreciones orofaríngeas de pacientes masculinos, con edades comprendidas entre 23-42 años y de procedencia ambulatoria.

Tabla 8. Distribución de las cepas de *C. dubliniensis*, según edad, sexo y tipo de muestra, obtenidas de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Febrero – junio de 2010.

Muestra	Cepa	Edad	Sexo	Procedencia
Secreción orofaríngea	SOFH13	23	Masculino	Hospitalizado
Secreción orofaríngea	SOFH14	31	Masculino	Ambulatorio
Secreción orofaríngea	SOFH18	42	Femenino	Ambulatorio
Secreción orofaríngea	SOFH20	39	Masculino	Ambulatorio
Orina	ORIA38	41	Femenino	Ambulatorio
Secreción orofaríngea	SOFH59	32	Masculino	Hospitalizado

En la tabla 9 se muestra la asociación entre el aislamiento de *C. dubliniensis* y los factores epidemiológicos y clínicos de los pacientes incluidos en este estudio, donde se puede observar que la mayoría de los pacientes a los cuales se le aislaron *C. dubliniensis* presentaban síntomas clínicos (9,8%) asociados al tipo de muestra estudiada; además, el mayor porcentaje de cepas aisladas pertenecen a pacientes del sexo masculino (18,2%), mayores de 30 años (43,8%) y los cuales presentaban tratamiento previo con fluconazol (7,8%), sin embargo, el análisis estadístico no arrojó asociación significativa entre el aislamiento de *C. dubliniensis* y la presencia de estos factores en los pacientes estudiados.

Entre los factores subyacentes evaluados, se encontró que los pacientes que presentaban VIH (9,8%) fueron los más frecuentemente hallados, seguidos por aquellos que presentaban hipertensión (4,1%). Al aplicar la prueba estadística de chi-cuadrado no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el aislamiento de *C. dubliniensis* y la presencia de factores subyacentes en los pacientes estudiados excepto en el caso de VIH, donde la mayoría de los pacientes a los cuales se les aisló *C. dubliniensis* presentaron esta enfermedad de base.

Tabla 9. Resultados del análisis de la asociación entre el diagnóstico de *C. dubliniensis* con las variables clínicas y demográficas de los pacientes.

Variable	Negativos		Positivos		Total		Significancia a
	n	%	n	%	n	%	
Sintomáticos	25	49,0	5	9,8	30	58,8	
Asintomáticos	20	39,2	1	2,0	21	41,2	$\chi^2= 1,68$ NS
Con tratamiento (fluconazol)	14	27,4	4	7,8	18	35,2	
Sin tratamiento	31	60,8	2	4,0	33	64,8	$\chi^2= 2,93$ NS
Sexo							
Masculino	18	35,3	4	7,8	22	43,1	
Femenino	27	52,9	2	4,0	29	56,9	$\chi^2= 1,53$ NS
Edad (años)							
<20	7	13,7	0	0,0	7	13,7	
20-25	10	19,6	1	2,0	11	21,6	
26-30	9	17,6	0	0,0	9	17,6	$\chi^2= 4,31$ NS
31-40	13	25,4	3	5,9	16	31,3	
>40	6	11,7	2	4,0	8	15,7	
Enfermedades subyacentes							
Diabetes	1	2,0	0	0,0	1	2,0	$\chi^2= 0,12$ NS
Hipertensión	2	3,9	1	2,0	3	5,9	$\chi^2= 1,69$ NS
VIH	23	45,1	5	9,8	28	54,9	$\chi^2= 5,49$ *
Sin enfermedad	19	37,2	0	0,0	19	37,2	$\chi^2= 3,35$ NS

NS: no significativo con corrección de Yates; *: significativo con corrección de Yates ($p < 0,05$); n: número de casos; VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

DISCUSIÓN

La identificación y diferenciación de *Candida dubliniensis* a partir de muestras clínicas, requiere de un conjunto de estrategias de aislamiento por parte del laboratorio clínico, como lo son: cultivo en agar cromogénico, crecimiento a 42 y 45°C, desarrollo en cloruro de sodio (NaCl) al 6,5%, formación de abundantes clamidoconidias en CMA, entre otras (Sullivan *et al.*, 2004); ya que debido a su gran similitud con *Candida albicans*, dicha especie presenta dificultad a la hora de su identificación, conllevando a diagnósticos erróneos y posibles errores terapéuticos.

En este estudio, de 211 muestras se obtuvieron 145 cultivos positivos, de los cuales se aislaron 150 cepas del género *Candida*, donde 45 cepas (30,0%) fueron identificadas fenotípicamente como presuntivas *C. albicans* un 6 cepas (4,0%) como posibles *C. dubliniensis* y el 99 cepas (66,0%) restante corresponde a otras especies. Las 6 cepas identificadas como presuntivas *C. dubliniensis*, produjeron colonias de color verde esmeralda en Chromatic *Candida*, colonias de color blanco-cremoso con pseudohifas y abundantes clamidoconidias en CMA adicionado con extracto de levadura al 10,0%, estas cepas no crecieron a 45°C ni en NaCl al 6,5%.

Entre las pruebas fenotípicas anteriormente mencionadas, los resultados confirmaron que la prueba de NaCl al 6,5% es un método sensible y específico (83,3%) para la identificación presuntiva de *C. dubliniensis*. Esta prueba ha sido aplicada en pocos estudios; sin embargo, trabajos realizados por Alves *et al.* (2002), y Al-Sweih *et al.* (2005), demostraron, que esta especie no crece en presencia de NaCl al 6,5%. Por su parte Álvarez *et al.* (2009), utilizaron el medio agar Sabouraud dextrosa y añadieron una cantidad en gramos de la sal, para así obtener una concentración de NaCl al 6,5%, donde de las 7 cepas, identificadas como *C. dubliniensis*, sólo 5 crecieron en el medio. En otro estudio realizado recientemente en Seúl, Corea, por Kim *et al.* (2010), emplearon esta

prueba, junto con otras, para determinar la frecuencia de *C. dubliniensis*, donde se pudo constatar que la prueba era confiable, demostrando la baja frecuencia de aislamiento de la levadura en ese país.

En cuanto a los resultados obtenidos con la siembra a 45°C para la diferenciación de *C. dubliniensis*, debe tenerse en cuenta la posibilidad de falsos positivos y falsos negativos, ya que en el presente estudio, el 50,0% de las cepas confirmadas molecularmente como *C. dubliniensis*, presentaron crecimiento a esta temperatura, a diferencia del estudio realizado por Mosca *et al.* (2002), donde ninguna de las 109 cepas de *C. dubliniensis* estudiadas por ellos, crecieron a 45°C. Gales *et al.* (1999) aislaron 66 cepas de *C. dubliniensis* que no crecieron a 45°C; sin embargo, el 23,0% de las cepas de *C. albicans* que estudiaron se desarrollaron débilmente o no crecieron a esta temperatura.

Los medios con sustratos cromogénicos permiten llegar a la identificación presuntiva de distintas levaduras, a la vez que permiten reconocer la existencia de infecciones por más de una especie simultáneamente. Sin embargo, las colonias se presentan en una gama de colores determinados y la caracterización de los mismos depende del observador. Por este motivo, no siempre es sencillo discriminar entre variaciones de tonalidades de un color para asignar, únicamente con esto, la correspondencia con la especie aislada. Algunos autores señalan que *C. dubliniensis* produce colonias de color verde más oscuro que *C. albicans* en el medio de CHROMagar *Candida* (Schoofs *et al.*, 1996; Freydiere *et al.*, 2001; Ellepola *et al.*, 2003). Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que no siempre se evidencia la diferencia de color y que basarse solamente en este aspecto puede llevar a confusión (Sullivan *et al.*, 1995; Ballesté *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005). En el presente estudio, ni las cepas control ni los aislamientos clínicos mostraron diferencias de tonalidad que permitieran diferenciar unas de otras.

El uso de Chromatic *Candida* y la formación de clamidoconidias, por si solos, no resultaron lo suficientemente específicos como ha sido reportado por otros autores, entre estos destacan, Schoofs *et al.* (1997) y Pinjon *et al.* (1998), quienes indicaron que las colonias de cultivos de *C. dubliniensis* después de 48 horas a 37°C se observaban de color verde oscuro, mientras que las colonias de *C. albicans* presentaban un verde más claro, característica que no fue observada en este análisis ya que la coloración de las colonias de *C. albicans* y *C. dubliniensis* cultivadas durante 72 horas a 30°C en el agar cromogénico Chromatic *Candida* no presentaron diferencia en la tonalidad de color. Con respecto a esto, Alvarez *et al.* (2009), reportaron, que esta diferencia de color se presentaba cuando las cepas eran cultivadas a temperaturas mayores de 37°C.

La producción abundante de clamidoconidias en medios como agar tomate, medio de Staib, medio con extracto de semilla de girasol, entre otros, es considerada por varios autores como buenos métodos para diferenciar entre ambas especies (Staib *et al.*, 1999; Al Mosaid *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006). En este estudio se empleó el medio agar harina de maíz, donde la producción de clamidoconidias no permitió diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, esto concuerda con el estudio realizado por Idrissi *et al.* (2007), quienes demostraron que esta prueba no podía ser utilizada para diferenciar estas dos especies debido a su subjetividad. Sin embargo, Kurzai *et al.* (2000), reportaron una sensibilidad y especificidad del 57,0% en la producción de clamidoconidias en CMA. Es por ello que se hace necesaria la aplicación de esta prueba, junto con otras, para la identificación fenotípica de *C. dubliniensis*.

Con respecto a la frecuencia de aislamientos de *C. dubliniensis*, en el presente estudio, se aislaron 6 cepas, lo que representa el 4,0% (6/150) de los casos; este resultado es similar al reportado por Ahmad *et al.* (2005) en Kuwait y al

descrito por Odds *et al.* (1998) en un trabajo retrospectivo, donde encontraron un 2,1% de aislamientos provenientes de distintas partes del mundo, y al trabajo de Jabra-Rizk *et al.* (2000), realizado en la Universidad de Maryland quienes encontraron 1,2% de aislamientos. En Venezuela existen pocos trabajos acerca de la prevalencia de esta especie, entre estos, destacan el realizado por Hartung *et al.* (2005), quienes aislaron 16 cepas (3,98%) de *C. dubliniensis* de 402 cepas provenientes de pacientes con HIV que presentaban orofaringitis recurrente, valores que son similares a los descritos en este estudio. A diferencia de, Mata *et al.* (2002) quienes encontraron un mayor porcentaje de *C. dubliniensis* (14,4%) entre 111 cepas previamente identificadas como *C. albicans*.

El mayor porcentaje de aislamientos de *C. dubliniensis* (83,3%) fueron obtenidas de mucosas orofaríngeas y en pacientes con VIH, mientras que una (1) cepa, aislada de una muestra de orina, provenía de un paciente hipertenso. Estos datos concuerdan con las localizaciones más frecuentes descritas en distintas investigaciones (Sullivan *et al.*, 1995; Odds *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2005). En Venezuela, Mendoza *et al.* (2006), realizaron un estudio donde aislaron *C. dubliniensis* de la cavidad oral de un niño desnutrido, quien no presentaba lesiones características de candidosis. Otro estudio realizado en Cuba por Perurena *et al.* (2006), reportaron 115 cepas aisladas de pacientes con candidiasis vaginal, de las cuales, el 88,6% fueron identificadas como *C. albicans* y 13 cepas fueron presuntivas *C. dubliniensis*. Por el contrario, en un trabajo realizado por López *et al.* (2005), en Argentina, no encontraron cepas de *C. dubliniensis* en 44 muestras de mucosa oral, con la utilización de métodos fenotípicos y moleculares; tampoco fueron aisladas en exudados vaginales por Buscemi *et al.* (2004) ni por Rodero *et al.* (1999) en diferentes muestras provenientes de pacientes que presentaban candidiasis nosocomial.

C. dubliniensis es reconocida hoy en día como patógeno humano; sin embargo,

su prevalencia es significativamente menor que la de *C. albicans* la cual sigue siendo la especie predominante en candidosis orofaríngeas en pacientes con o sin VIH. Como lo demuestran estudios realizados por Tintelnot *et al.* (2000), quienes aislaron 170 levaduras del género *Candida* provenientes de 150 pacientes con VIH en Berlín, Alemania, de las cuales 117 cepas pertenecían a la especie *C. albicans* y sólo 53 a *C. dubliniensis* y Domaneschi *et al.* (2011), quienes aislaron en mayor porcentaje *C. albicans* (80,0%) de la mucosa oral en 117 niños con VIH.

Los productos amplificados con PCR, de las cepas, lograron establecer diferencias entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Para esto se realizó una amplificación de un producto de un gen específico para *C. dubliniensis* de 288 pb (figura 11). Esta técnica demostró ser reproducible, específica y sensible para la detección de la especie, a pesar de esto es recomendable, que la estandarización de la PCR se realice en cada laboratorio que vaya a investigar sobre la misma, para así poder adaptar la técnica a las condiciones de cada uno de estos. Los resultados arrojados confirmaron que 2 de los 3 perfiles (I y II) presuntivos para *C. dubliniensis*, permiten establecer una identificación fenotípica específica de la especie, ya que todas las cepas incluidas en estos perfiles resultaron positivas en la PCR específica para *C. dubliniensis*.

La resistencia a los antifúngicos se ha convertido en un importante problema, especialmente para los pacientes inmunosuprimidos, dicha resistencia se ha visto enmarcada en aquellos pacientes que han tenido una exposición prolongada a azoles, como el fluconazol. Todavía no se ha establecido exactamente el tratamiento a seguir en las infecciones por *C. dubliniensis*. En el presente estudio 4 de los aislados correspondientes a *C. dubliniensis* fueron resistentes a fluconazol (tabla 6). Esto puede deberse a que las cepas fueron aisladas de pacientes con VIH que estaban recibiendo tratamiento con antifúngicos. Perea *et al.* (2002), reportaron resultados similares, demostrando

que esta especie presenta altos niveles de resistencia a dicho antifúngico y en menor medida a otros azoles (Pfaller *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2002), destacando como mecanismo de resistencia más frecuente la sobreexpresión de la proteína Mdr1p (codificada por el gen CdCDR1), mientras que en *C. albicans* la proteína que se sobreexpresa es Cdr1 (gen CDR1-CDR2).

Igualmente se encontró resistencia de estas 4 cepas a itraconazol y voriconazol. La alta resistencia de aislados de *C. dubliniensis* al itraconazol puede ser consecuencia de una resistencia cruzada con el fluconazol, debido a que los mecanismos de acción de ambas drogas se basan en el mismo principio, inhibir el citocromo P450 fúngico de la enzima 14 α -demetilasa. Esta inhibición previene la conversión del anosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática, y subsecuente acumulación de 14 α -metil esteroides (Hartung *et al.*, 2005).

Hasta ahora, la mayoría de los aislados de *C. dubliniensis* habían sido reportados como susceptibles a una amplia gama de antifúngicos, haciendo poco probable que la aparición de resistencia en *C. dubliniensis* se debiera a una selección por la terapia antifúngica (Sullivan *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso continuo e indiscriminado de antifúngicos puede promover la resistencia en esta especie e imponer secundariamente una presión selectiva sobre estas cepas resistentes (Borg *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Morán *et al.* (1997), demostraron que la exposición *in vitro* al fluconazol no solo resulta en una selección de aislados con reducida susceptibilidad, sino que incrementa la adherencia de esta especie a las células epiteliales y produce un incremento en los niveles de secreción de proteinasas. A pesar de esto, *C. dubliniensis* no predomina entre la flora normal de la cavidad oral y mucosa vaginal, y *C. albicans* continúa siendo la especie más patógena aislada de estas mucosas (Sullivan *et al.*, 2005). Ruhnke *et al.* (2000),

demonstraron que *C. albicans* y *C. dubliniensis* desarrollaban resistencia al fluconazol en pacientes que estaban expuestos continuamente a esta droga, aspecto que se evidenció en este estudio, donde un 7,8% de los pacientes con tratamiento antifúngico presentaron resistencia a fluconazol así como también a itraconazol y voriconazol.

En este estudio se obtuvo un 7,8% de aislamientos en pacientes masculinos y un 9,9% en edades comprendidas entre 31 y 40 años de edad. No hay trabajos que demuestren que factores epidemiológicos como edad o sexo sean importantes en la prevalencia de *C. dubliniensis*.

C. dubliniensis ha sido identificada como una levadura patógena asociada principalmente a candidiasis oral y particularmente en pacientes infectados con VIH. Estudios epidemiológicos son requeridos para establecer la importancia clínica de este microorganismo, particularmente por su habilidad de desarrollar resistencia *in vitro* al fluconazol. En base a esto es necesario el desarrollo y aplicación de técnicas que conlleven a la identificación y diferenciación de *C. dubliniensis* de otras especies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, entre las que se recomiendan crecimiento en NaCl al 6,5%, desarrollo a 45°C y formación de clamidoconidias.

CONCLUSIONES

Candida dubliniensis se aisló con mayor frecuencia de la cavidad oral en pacientes con VIH.

Es posible realizar la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la aplicación de pruebas fenotípicas como el crecimiento a 45°C y en medios con NaCl al 6,5%.

El análisis por PCR sirve para confirmar aislamientos de *C. dubliniensis*.

El uso continuo e indiscriminado de antifúngicos puede promover la resistencia de *C. dubliniensis*.

A pesar de que *C. dubliniensis* es reconocida como patógeno humano, su prevalencia es significativamente menor que la de *C. albicans*, la cual sigue siendo la especie predominante en pacientes con candidosis.

RECOMENDACIONES

Es recomendable utilizar, al menos, tres métodos fenotípicos para diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, ya que, a diferencia del método molecular, ninguna de estas pruebas es absolutamente sensible o específica para discriminar entre ambas especies.

A pesar de que la frecuencia de *C. dubliniensis* es significativamente menor que la de *C. albicans*, en pacientes con candidosis, se recomienda continuar el estudio de aislamiento de esta especie, principalmente en pacientes con VIH, con el fin de vigilar la emergencia de resistencias.

Cada laboratorio debe estandarizar la PCR especie específica para *C. dubliniensis*, para así adaptar la técnica a las condiciones del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, S.; Mokaddas, E.; Al-Sweih, N. y Khan, Z. 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida dubliniensis* isolates from clinical specimen in Kuwait. *Med. Princ. Pract.*, 14: 77-83.

Al-Mosaid, A.; Sullivan, D.; Salkin, I.; Shanley, D. y Coleman, D. 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 323-327.

Al-Sweih, N.; Ahmad, S.; Khan, Z.; Khan, S. y Chandy, R. 2005. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycopath.*, 48: 347-351.

Alvarez, M.; Suarez, B. y Caicedo, L. 2009. Isolation of *Candida dubliniensis* for the First Time in Cali, Colombia, and its Identification with Phenotyping Methods. *Mycopath.* 167: 19-24.

Alves, S.; Loreto, E.; Linares, C.; Silveira, C.; Scheid, L. Pereira, D. 2006. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 49: 220-225.

Alves, S.; Milan, E.; de Laet, P.; Oliveira L.; Santurio, J. y Colombo, A. 2002. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43: 85-86.

Anane, S.; Kallel, K.; Kaouech, E.; Belhaj, S. y Chaker, E. 2007. *Candida dubliniensis*: a novel emerging species. *Ann. Biol. Clin.*, 65(1): 13-19.

Arenas, R. 2003. *Microbiología Médica Ilustrada*. 2da edición. Editorial Interamericana. McGraw-Hill. México-México.

Ballesté, R.; Arteta, Z.; Fernández, N.; Mier, C.; Mousqués, N. y Xavier, B. 2005. Evaluación del medio cromógeno CHROMagar *Candida* TM para la identificación de levaduras de interés médico. *Rev. Méd. Urug.*, 21: 186-193.

Bennett, J. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbio. Rev.*, 16: 497-516.

Brena, S.; Rubio, M.; Salesa, R.; Iglesias, I.; Gil, J. y Rezusta, A. 2003. Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos. *Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 20-23.

Blignaut, E.; Pujol, C.; Joly, S. y Soll, D. 2003. Racial distribution of *Candida dubliniensis* among South Africans. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1838-1842.

Borg, M.; Niedrhaus, T.; Gross, U.; Seibold, M.; Monod, M. y Tintelnot, K. 2002.

Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. *AIDS.*, 6: 1237-1244.

Brown, D.; Jabra-Riak, M.; Falkler, W.; Baqui, A. y Meiller, T. 2000. Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV-seropositive pediatric dental patients. *Pediatr. Dent.*, 22(3): 234-238.

Buscemi, L.; Arechavala, A. y Negroni, R. 2004. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 177-1781.

Cantón, E.; Viudes, A. y Pemán, J. 2001. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev. Iberoam. Micol.*, 18: 51-55.

Casas, G. 1994. *Micología General: Hongos y su campo de acción*. Segunda edición. Editorial Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

Chunchanur, S.; Nadgir, S.; Halesh, L.; Patil, B.; Kausar, Y. y Chandrasekhar, M. 2009. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Ind. Jour. Pathol. Microbiol.*, 52(4): 501-504.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Tercera edición. M44-A. National committee for clinical and laboratory standards, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Cuévara, M.; Alambra, A. y del Palacio, A. 2006. Diagnóstico microbiológico tradicional de la candidiasis invasora en el enfermo crítico no neutropénico. *Rev. Iberoam. Micol.*, 23: 4-7.

Delgado, M.; Bastardo, M.; Barroeta, S.; Batistini, F.; Borelli, D.; Perez, M. y Cabello, I. 1996. *Temas de micología*. Caracas-Venezuela.

Dolapci, I.; Tekeli, A.; Gocmen, J.; Aysev, D. y Guria, H. 2002. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp-positive hemocultures. *APMIS.*, 110(5):

391-395.

Domaneschi, C.; Massarente, D.; De Freitas R.; de Sousa, H.; Paula, C.; Migliari, D.; Antunes, J. 2011. Oral colonization by *Candida* species in AIDS pediatric patients. *Oral. Dis.*, 17: 393-398.

Donnelly, S.; Sullivan, D.; Shanley, D. y Coleman, D. 1999. Phylogenetic analysis and identification of *Candida dubliniensis* based on analyses of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiol.*, 145: 1871-1882.

Duarte, A.; Marquez, A.; Araujo, C. y Pérez, C. 2009. Modalidades de la prueba del tubo germinal. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 29: 1.

Ellepola A.; Hurst, S.; Elie, C. y Morrison, C. 2003. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol.*, 18: 379-388.

Freydiere, A.; Guinet, R. y Boiron, P. 2001. Yeast in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Micol.*, 39: 9-33.

Gales, A.; Pfaller, M.; Houston, A.; Joly, A.; Sullivan, D.; Coleman, D. y Soll, D. 1999. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xilose and – methyl – d – glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC system. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 3804-3808.

Godoy, P.; Tiraboschi, I.; Severo, L.; Bustamante, B.; Calvo, B.; De Almeida, L.; Da Matta, D. y Colombo, A. 2003. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from latin American Hospitals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 98(3): 401-405.

Gorther, C. 1996. Enfermedades Micóticas. *Not. Post.*, 2(4): 506-508.

Gutierrez, J.; Morales, P.; Gonzalez, M. y Quindos, G. 2002. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic. Microbiol.*, 42(3): 207-227.

Hartung, C.; Maa-essayag, S.; Perez, C.; Colella, M.; Rosello, A.; Olaizola, C. y Magaldi, S. 2005. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycophatol.*, 160: 227-234.

Hartz, S.; Pipolo, E.; Oliveira, L.; Santurio, J. y López, A. 2002. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 43: 85-86.

Idrissi, N.; Essari, A.; Abdallaoui, M. y Youssef, M. 2007. First identification of *Candida dubliniensis* at Ibn Rochdm University Hospital of Casablanca (Morocco). *J. Med. Mycol.*, 17: 77–81.

Jabra-Rizk, M.; Falker, W.; Merz, W.; Baqui, A.; Kelley, J. y Meiller, T. 2000. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)–infected and non–HIV–infected individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1464-1468.

Jewtuchowicz, V.; Mujica, M.; Brusca, M.; Sordelli, N.; Malzone, M.; Pola, S.; Iovannitti, C. y Rosa, A. 2008. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 23(6): 505-509.

Jiménez, R. 2000. Bioestadística. *Métodos Estadísticos Descriptivos*. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Khan, Z.; Ahmad, S.; McKaddas, E. y Chandy, R. 2004. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 590-592.

Khelif, M.; Sellami, A.; Sellami, H.; Makni, F. y Ayadi, A. 2008. *Candida dubliniensis*, identification methods and epidemiologic implication. *Pathol. Biol.*, 27(4): 320-336.

Kim, T.; Park, B.; Kim, H. y Lee, M. 2010. *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea. *Clin. Lab. Anal.*, 24:145-148.

Kobold, M. 2000. *Setas de Prados y Bosques. Como identificarlas, respetarlas, recogerlas y cocinarlas*. Susaeta Ed. S. A. España.

Koehler, A.; Chu, K.; Honang, E. y Cheng, A. 1999. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 422-436.

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Jonda, W.; Sommers, H. y Winn, W. 1999. *Diagnóstico microbiológico*. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. México.

Kurtzman, C. y Fell, V. 1998. The yeasts, a taxonomic study. Cuarta edición. Elsevier Science . B.V. Amsterdam.

Kurzai, O.; Korting, H.; Harmsen, D.; Bautsch, W.; Molitor, M. y Frosch, M. 2000. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J. Mol. Med.*, 78: 521–529.

Lasker, B.; Elie, C. y Lott, T. 2001. Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV- positive patients at successive clinic visits. *Med. Micol.*, 39: 341-352.

López, C.; Giro, L.; Ramos, L.; Ramadan, S. y Bulacio, L. 2005. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev. Arg. Microbiol.*, 37: 16-21.

López-Ribot, J.; McAtee, R.; Kirkpatrick, W.; Perea, S. y Patterson, T. 2000. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Rev. Iberoamer. Micol.*, 17: 49-54.

Martínez, M.; López-Ribot, J.; Kirkpatrick, W.; Coco, B.; Bachmann, S. y Patterson, T. 2002. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3135-3139.

Mata, S.; Hartung, C.; Sánchez, L.; Gallardo, S.; Pérez, C.; Colella, M.; Magaldi, S.; Reyes, H.; Ontiveros, J.; Olaizola, C. y Suárez, R. 2002. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en Venezuela. *Antibiot. infecc.*, 10(4): 165-170.

Mazziotta, D. y Fernández, C. 2005. *Gestión de la calidad en el laboratorio clínico*. Editorial Médica Panamericana.

McCullough, M.; Hepworth, G.; Gordon, I.; Clemons, K. y Stevens, D. 2009. Molecular epidemiology of global *Candida dubliniensis* isolates utilizing genomic-wide, co-dominant, PCR-based markers for strain delineation. *Med. Mycol.*, 7: 1-7.

Mello, B. 2009. Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme. Pós-graduação. Faculdade de odontologia. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Mendoza, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 25: 13-21.

Mendoza, M.; Brito, A.; Díaz, E. y Ramos, R. 2006. Especies de candida en cavidad oral en niños desnutridos: a propósito de un caso de *Candida dubliniensis*. *Kasmera*, 34(2): 119-122.

Mendoza, M. y Diaz, E. 2001. Producción de Clamidosporas y micelio en levaduras empleando diversos medios de cultivos. *Bol. Inf.*, 35: 15.

Mesa, L.; Arcaya, N.; Caños, O.; Machado, Y. y Calvo, B. 2004. Evaluación de los caracteres fenotipicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 135-138.

Mesa, L.; Arcaya, N.; Pineda, M.; Beltrán-Luengo, H. y Calvo, B. 2005. Candidemia en el Hospital Universitario de Maracaibo Estado Zulia, Venezuela 2000-2002. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 25: 109-113.

Morán, G.; Sullivan, D.; Henman, M.; McCreary, C.; Harrington, B. y Shabley, D. 1997. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole – resistant derivatives in vitro. *Antimic. Agent. Chemother.*, 41: 617-623.

Mosca, C.; Maragues, M.; Llovo, J.; Al Mosaid, A.; Coleman, D. y Ponton, J. 2002. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1259–1262.

Murray, D.; Baren, E.; Jorgensen, J.; Pfaller, M. y Tenover, R. 2003. *Manual of clinical microbiology*. Octava edición. American society for microbiology, Washinton, D.C.

Odds, F.; Van Nuffel, L. y Dams, G. 1998. Prevalence of *candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2869-2873.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2001. *Bioética*. Principios éticos para los Investigadores en seres humanos. Publicación científica. OMS-OPS.

Pardi, G.; Cardozo, E.; Perrone, M. y Salazar, E. 2003. Detección de especies de *Candida* en casos de recidiva en pacientes con Estomatitis sub-protésica, medicados con Miconazol Jalea Oral. *Act. Odont. Ven.*, 41(2): 108-119.

Perea, S.; López-Ribot, J.; Wickes, B.; Kirkpatrick, W.; Dib, O.; Bachmann, S.; Keller, S.; Martinez, M. y Patterson, T. 2002. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. *Antimicr. Agen. Chemothe.*, 46: 1695-1703.

Perurena, M.; Fernández, C.; Martínez, G.; Mendoza, D. y Valdés, E. 2006.

Candida dubliniensis: necesidad de establecer un diagnóstico correcto. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 58: 23-25.

Pfaller, M.; Messer, S.; Joly, S.; Pujol, C.; Sullivan, D.; Coleman, D. y Soll, D. 1999. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 870-872.

Pinjon, E.; Sullivan, D.; Salkin, I.; Shanley, D. y Coleman, D. 1998. Simple, inexpensive reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2093-2095.

Rodero, L.; Davel, G.; Córdoba, S.; Soria, M.; Canteros, C. y Hochenfellner, F. 1999. Estudio multicéntrico sobre candidiasis nosocomial en la República Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 31: 114-119.

Ruhnke, M.; Schmidt-Westhausen, A. y Morschhauser, J. 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antemi. Chemoth.*, 46: 291-295.

Sánchez, M. 2006. Espectro clínico de la candidiasis invasora en el paciente crítico no neutropénico. *Rev. Iberoam. Micol.*, 23: 8-11.

Sanduen, P. 2000. Epidemiology of Candidemia. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: 73-81.

Schoofs, A.; Odds, F.; Colebunders, R.; Leren, M. y Goosserss, H. 1996. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* from HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16: 296-300.

Schoofs, A.; Odds, F.; Colebunders, R.; Ieven, M. y Goossens, H. 1997. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16: 296-300.

Staib F. y Morschauer, J. 1999. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses.*, 42: 521-524.

Sullivan, D.; Moran, G. y Coleman, D. 2005. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 253: 9-17.

Sullivan, D.; Moran, G.; Pinjon, E.; Al-Mosaid, A.; Stokes, C. y Vaughan, C. 2004. Comparison of the epidemiology, drug, resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS. Yeast. Rest.*, 4: 369-376.

Sullivan, D.; Westerneng, T.; Haynes, K.; Bennett, D. y Coleman, D. 1995. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol.*, 141: 1507-1521.

Tintelnot, K.; Hase, G.; Seibold, M.; Bergmann, F.; Staemmler, M. y Franz, T. 2000. Evaluation of phenotypic markers or selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 1599-1608.

Wahyuningsih, R.; Freislebon, H.; Sonntag, H. y Schnitzler, P. 2000. simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2000.

Zaragoza, R. y Pemán, J. 2006. Invasive fungal infections in critically ill patients: Different therapeutic options and a uniform strategy. *Rev. Iberoam. Micol.*, 23: 59-63.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	.DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE <i>Candida dubliniensis</i> AISLADAS DE PACIENTES CON CANDIDOSIS EN DIFERENTES CENTROS DE SALUD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Higuerey Eduardo	CVLAC	16995898
	e-mail	ed18_04@hotmail.com
	e-mail	
Ortiz Fernando	CVLAC	18418058
	e-mail	Fernan175@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Levadura
Ambulatorios
Hospitalizados
Aislados

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOANALISIS

Resumen (abstract):

Candida dubliniensis es una especie estrechamente relacionada con *Candida albicans*. La diferenciación de ambas especies por los métodos micológicos convencionales no es sencilla, razón por la cual se ha recurrido a técnicas moleculares para la correcta identificación de *C. dubliniensis*. En este sentido, en la presente investigación se identificó fenotípicamente y molecularmente a *Candida dubliniensis* en diferentes muestras obtenidas de pacientes hospitalizados y ambulatorios de Cumaná, estado Sucre. Se aislaron 150 levaduras entre los meses de febrero y junio de 2010. Para la identificación de las especies se estudió el color de las colonias en un medio con sustrato cromogénico (Chromatic *Candida*), la producción de clamidoconidias en agar harina de maíz con 1,0% de extracto de levadura; en este último medio, también se evaluaron las características micromorfológicas de las colonias utilizando la técnica de Dalmau. Cincuenta y un (51) aislamientos que desarrollaron color verde esmeralda en Chromatic *Candida*, produjeron tubos germinales en suero humano y clamidoconidias en agar harina de maíz, fueron identificados como presuntivos *C. albicans*. Para diferenciar cuales de ellos correspondían a *C. dubliniensis*, se utilizaron distintos métodos fenotípicos como la capacidad de desarrollo a 45°C y en NaCl al 6,5% y se evaluó la utilidad de cada técnica para obtener un esquema de identificación simple y confiable. A los aislados obtenidos se les realizó amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para *C. dubliniensis* y realizando modificaciones de la técnica inicial hasta llegar a estandarizar una prueba en el laboratorio, con el fin obtener una identificación definitiva de la especie. El 4,0% de los aislamientos correspondió a *C. dubliniensis*. No se pudo diferenciar entre ambas especies basándose en el color desarrollado en el medio Chromatic *Candida*. Las pruebas fenotípicas que resultaron más sensibles y específicas fueron: crecimiento en medio con NaCl al 6,5% y desarrollo a 45°C. La PCR demostró ser una técnica útil para diferenciar entre ambas especies. Se recomienda utilizar, por lo menos, 3 métodos fenotípicos diferentes para discriminar entre estas dos especies. Encontraron, ya que probablemente utilicen esta área como de resguardo larval, debido a la relativamente alta concentración de alimento. Los análisis muestran un comportamiento esperado, ya que la mayoría de las especies de peces costeros del área, aprovechan la tranquilidad de las aguas y las relativamente elevadas concentraciones de nutrientes que proporciona la zona

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail
PARRA EVIS	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC
	e-mail
	e-mail
JURADO	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC
	e-mail
	e-mail
JURADO	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC
	e-mail
	e-mail

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2011	10	7
-------------	-----------	----------

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-higuereyortiz.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: Nacional
Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/marija

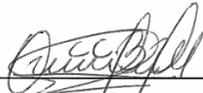
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

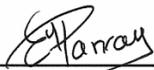
Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



AUTOR 1



AUTOR 2



TUTOR