

# Formación de clamidoconidios de *Candida albicans* y *C. dubliniensis* en diferentes medios líquidos y condiciones de incubación

Karla Juárez Reyes<sup>1</sup>

Javier Araiza<sup>2</sup>

Alexandro Bonifaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D. F. <sup>2</sup>Departamento de Micología, Servicio de Dermatología, Hospital General de México, México D. F.

## Formation of chlamydoconidia of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in different liquid media and conditions of incubation

**Abstract.** *Candida albicans* and *C. dubliniensis* display similar phenotypic and pathogenic characteristics. Thus, the search for accurate tests to differentiate these two species is under way. A simple phenotypic test that differentiates these two species is the production of chlamydoconidia. *Candida albicans* develops terminal chlamydoconidia, whereas *C. dubliniensis*, tend to form multiple chlamydoconidia. Currently the formation of these structures is made in solid culture media. However, this approach takes more than 48 h. In this study we have demonstrated that supplemented liquid media with milk in agitation has the advantage to produce chlamydoconidia in shorter periods of time than the average conventional methodologies. Although chlamydoconidia rapidly developed in this medium, the differentiation of both species by this method proved to be difficult.

**Key words:** Candidiasis, chlamydoconidia, liquid media.

**Resumen.** *Candida albicans* y *C. dubliniensis* presentan características, patogénicas y fenotípicas muy similares, por ello, se ha tratado de buscar algunas pruebas eficientes que nos permitan diferenciarlas. Una prueba fenotípica que ha marcado diferencia entre estas dos especies es la producción de clamidoconidios; debido a que las cepas de *C. albicans* forman clamidoconidios terminales y únicos mientras que *C. dubliniensis* forma clamidoconidios múltiples. Actualmente la formación de estas estructuras se realiza en medios sólidos, sin embargo, el tiempo que se emplea es superior a 48 h. En el presente trabajo se demostró que el empleo de medios de cultivo líquidos en agitación y suplementados con leche, miel, o Tween 80, tienen la ventaja de producir clamidoconidios en periodos más cortos que los medios empleados convencionalmente. Sin embargo, la diferenciación de ambas especies por este método no fue posible.

**Palabras clave:** Candidiasis, clamidoconidios, medios de cultivo líquidos.

Received 8 May 2007; accepted 3 December 2007.

Recibido 8 de mayo 2007; aceptado 3 de diciembre 2007.

## Introducción

La candidosis es la micosis oportunista más frecuente, ocasionada principalmente por *Candida albicans*, por ello, se debe contar con técnicas que permitan identificar y

*Autor para correspondencia: Alexandro Bonifaz,  
a\_bonifaz@yahoo.com.mx*

diferenciar a esta especie. Las pruebas fenotípicas son una herramienta que nos ayudan a identificar a *C. albicans* de una manera fácil y sencilla; una característica importante que permite diferenciar a ésta de otras especies, es su capacidad de producir clamidoconidios. Generalmente la formación de estas estructuras se realiza en medios de cultivo sólidos, pobres en nutrientes, para inducir en esta especie la formación

de pseudohifas e hifas. Estos medios sólidos en general son efectivos para la obtención de formas bien definidas, sin embargo, el principal inconveniente es el tiempo de incubación que se emplea: superior a 48 h [6, 10, 11].

Actualmente se ha reportado que con el empleo de medios de cultivo líquidos elaborados a base de harina de maíz y suplementos lácteos, se tiene la ventaja de producir clamidoconidios en periodos más cortos que en los medios utilizados convencionalmente, además de tener la ventaja de ser medios económicos y de fácil elaboración [5, 9, 18].

En 1995, Sullivan *et al.* [16] reportaron por primera vez la presencia de una nueva especie a la cual se denominó *Candida dubliniensis*, ésta presenta características patogénicas y fenotípicas muy similares a *C. albicans*, sin embargo, una de las características que justamente ha marcado diferencia entre ambas cepas es la producción de clamidoconidios, siendo para *C. albicans* terminales y únicos mientras que para *C. dubliniensis* son múltiples [7]. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar una metodología para la formación de clamidoconidios en medios líquidos, a base de diversas harinas más suplementos en tiempos menores a los estandarizados, y como objetivo secundario la posible diferenciación de ambas especies.

## Materiales y métodos

### Cepas

El presente estudio incorporó 6 cepas previamente identificadas para la producción de clamidoconidios en diferentes medios líquidos. Las cepas de *Candida* estudiadas fueron las siguientes: *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (cepas testigos negativos), *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1545, *C. dubliniensis* 04, *C. dubliniensis* 30; éstas últimas obtenidas e identificadas en el laboratorio de Micología, del Servicio de Dermatología del Hospital General de México.

### Medios de cultivo

Los medios empleados y preparados fueron los siguientes:

- HMTw. Caldo harina de maíz al 3% más 1% de Tween 80.
- HMLE. Caldo harina de maíz al 3% más 5% de leche entera.
- HMLEMi. Caldo harina de maíz al 3% más 5% de leche entera más 1% de miel de abeja.
- HMLB. Caldo harina de maíz al 3% más 5% de leche recién ordeñada.
- HMLBMi. Caldo harina de maíz al 3% más 5% de leche recién ordeñada más 1% de miel de abeja.
- CTw. Cerelac (compuesta por: harina de trigo, maíz, arroz y cebada; leche parcialmente descremada, glucosa y aceite de maíz) al 3% más 1% de Tween 80.
- También se diseñaron medios de cultivo líquidos con harina de arroz (HA) y con avena (Av), en la misma proporción que la harina de maíz; haciendo un total de 16 medios de cultivo líquidos.

### Preparación del inóculo

Se realizaron suspensiones en agua estéril de cada una de las cepas de trabajo, ajustándose a una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). La inoculación en incubación se llevó a cabo en cada uno de los medios, con cada una de las cepas en estudio. Cada medio fue inoculado con 0.1 mL de las suspensiones y se incubaron a 28° y 41°C por 16 h, con agitación permanente a 150 rpm.

La formación de clamidoconidios fue determinada una vez terminada la incubación de cada una de las cepas en los medios respectivos mediante análisis microscópico: se colocaron entre porta y cubreobjetos una gota de medios de cultivo líquido, posteriormente se llevó a cabo el análisis microscópico de cada una de las muestras obtenidas. La observación y clasificación de las clamidoconidios fue hecha por dos observadores de forma independiente.

## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de las cepas en estudio en los diversos medios de cultivo fueron variables. El medio que presentó los mejores resultados en producción de clamidoconidios en el menor tiempo fue el medio HALEMi a 28°C, por lo tanto estos resultados se presentan en la Tabla 1. Los clamidoconidios de cada una de las especies se muestran en las Figuras 1 y 2.

La producción de clamidoconidios se vio favorecida en los medios de harina de arroz + leche entera (HALE), harina de arroz + leche entera + miel de abeja (HALEMi), avena + leche entera + miel de abeja (AvLEMi) y Cerelac + tween 80 (CTw), ya que sólo en estos cuatro medios se logró obtener la producción más eficiente de dichas estructuras para todas las cepas.

A diferencia de otros estudios elaborados por García-Hernández [4] y Nakamoto [9], en los cuales se han

reportado que con el empleo del medio de cultivo líquido CMB (Cornmeal Broth) suplementado con 5% de leche se logró obtener una producción eficiente de clamidoconidios, en el presente trabajo no fue así. De igual manera, en ninguno de los medios que contenían leche recién ordeñada se obtuvieron buenos resultados, la explicación que consideramos es que posiblemente la contaminación bacteriana pudo haber afectado, ya que la leche se añadió sin previa esterilización.

Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1525 y *C. dubliniensis* 4 tuvieron un comportamiento similar en todos los medios de cultivo, observándose favorecida la producción de clamidoconidios a 28°C; de esta manera se confirma lo expresado en otros estudios [4], en donde registraron los mejores resultados bajo las condiciones ideales de incubación que incluye una temperatura de 28°C, mientras que Nakamoto [9] reportó que la temperatura óptima de incubación se encuentra dentro del intervalo de 24-30°C, sin embargo, para la cepa de *C. dubliniensis* 30 los mejores

Tabla 1. Producción de clamidoconidios de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en el medio HALEMi, a 28°C y 150 rpm

Medio: HALEMi		Tiempo (h)									
		8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	++	+	++	++	++	++	+++	
	Pseu	+	+	+	+	++	+	++	++	+++	
	CUT	+	+	+	+	+++	+	++	++	+++	
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	++	+	+	+	+	+	++	++	++	
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	CUT	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	
	Pseu	+	++	+	+	++	++	++	+	++	
	CUT	+	+	+	+	+++	++	+	+	++	
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	++	++	+++	++	++	+++	++	++	
	Pseu	-	-	-	-	+	-	+	+	+	
	CUT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidios Únicos Terminales, (CM) Clamidoconidios Múltiples.

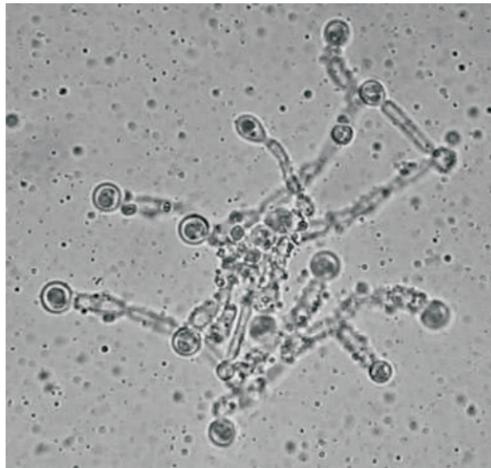


Figura 1.- Clamidoconidios de *C. albicans* en medio HALEMi (28°C y 150 rpm). (400 X).

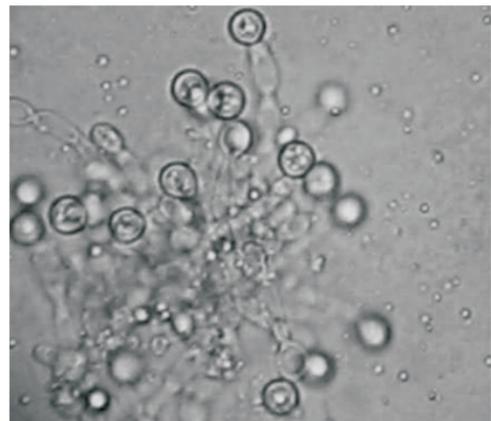


Figura 2.- Clamidoconidios de *C. dubliniensis* en medio HALEMi (28°C y 150 rpm). (400 X).

resultados se obtuvieron a 41°C.

En cuanto al tiempo de incubación, se pudo observar que la formación de pseudohifas comenzó a partir de las 8 h y de clamidoconidios (en una cantidad significativa) a partir de las 12-14 h, mientras que en otros estudios [4, 9], la producción más eficiente se tuvo a las 16 y 20 h. Es probable que la variación tanto en las condiciones de incubación, como en las formulaciones de los medios de cultivo diseñados, permitan obtener una producción más eficiente de clamidoconidios para *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Es importante hacer notar que morfológicamente la

producción de clamidoconidios obtenidos por medios sólidos es totalmente diferente a las de medios líquidos. En los primeros se observan todas las estructuras micóticas en un primer plano, con el desarrollo de pseudohifas que permiten ver definidas a éstas, mientras que en los probados en este estudio, dan la formación de pseudohifas que se proyectan excéntricamente (Figuras 1 y 2), es decir todas las pseudohifas e hifas salen de un punto hacia el exterior, por lo tanto la formación de los clamidoconidios, se dan en la periferia de esta proyección. La explicación que se puede dar a esta formación, es debida a que en el medio líquido, todas las pseudohifas e hifas quedan suspendidas, y el otro factor que contribuye es la agitación que genera una fuerza centrífuga. Este tipo de observaciones, son similares a lo reportado en los trabajos previos [4, 18]. Aunado a la explicación morfológica anterior, esto apoya que no es posible por este método, la diferenciación entre las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. La producción de clamidoconidios en medios líquidos ha sido recientemente reportada por Staib & Morschhäuser [15], sin embargo, el estudio no hace comparación con los de *C. albicans*.

Específicamente en nuestro estudio, para las cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1525 y *C. dubliniensis* 4 la temperatura a la cual se observaron mejores resultados de producción de clamidoconidios fue a 28°C, mientras que para *C. dubliniensis* 30 se vio favorecida a 41°C. El intervalo de tiempo mínimo en el cual se logró una producción considerable de clamidoconidios fue de 12 h. La diferenciación entre las cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* no se logró, debido a que en la producción de clamidoconidios en ambas especies se observaron solamente como únicas terminales y no las múltiples reportadas para *C. dubliniensis*. El medio de HALEMi fue el mejor, ya que la eficiencia en cuanto a la producción de clamidoconidias es mayor a 28 y 41°C, seguido de los medios HALE a 41°C y Cerelac y AvLEMi a 28°C.

La diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*

no fue posible con estos medios y condiciones, debido a que las estructuras obtenidas eran prácticamente iguales. De aquí que la metodología de diferenciación entre ambas especies siga siendo por las pruebas fenotípicas previamente descritas como son térmicas, bioquímicas y fisiológicas [1-3, 8, 12, 14, 16, 17].

Las variaciones propuestas en las formulaciones de los medios y tiempos de incubación no presentaron diferencias significativas (Chi cuadrada, nivel de significancia = 0.01), ello indica que se pueden utilizar cualquiera de los medios a las temperaturas indicadas sin que ello provoque diferencias en los resultados que se esperan obtener [13].

En resumen, el empleo de medios de cultivo líquidos tiene la ventaja de producir clamidoconidios en periodos más cortos que los medios empleados convencionalmente, además de ser medios económicos y de fácil elaboración. Aunque el uso de incubadoras que incluyan un sistema de agitación puede limitar el empleo de esta técnica en laboratorios que no cuentan con este equipo; esta metodología sólo contribuye a la producción rápida de clamidoconidios.

## Agradecimientos

A la M en C. Pilar Granados, por las facilidades en la elaboración de este trabajo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Química, UNAM.

## Literatura citada

- Al Mosaid, A., D. Sullivan, D. Coleman, 2003. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4787-4789.
- Al Mosaid, A., D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley, D. Coleman, 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Stain agar and Caffeic Acid-Ferric citrate agar. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 323-3227.
- Gales, A., M. Phaller, A. Houston, S. Joly, D. Sullivan, D. Coleman, D. Soll, 1999. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C and Vitek YBC Systems. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3804-3808.
- García-Hernández, MH, 2005. Producción rápida de clamidoconidios de *Candida albicans* en medios líquidos y diferentes condiciones de incubación. Tesis de licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas. UASL, San Luis Potosí, México.
- Jitsuron S, S. Kiamsiri, N. Pattararangrong, 1993. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 123: 95-98.
- López-Martínez R, L.J. Méndez-Tovar, F. Hernández-Hernández, R. Castañón-Olivares, 2004. Candidosis. In: *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2ª edición, editorial Trillas, México DF., pp. 99-107
- Mesa, L., N. Arcaya, O. Cañas, Y. Machado, B. Calvo, 2004. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 135-38.
- Mosca, C., M. Moragues, J. Llovo, A. Al Mosaid, D. Coleman, J. Pontón, 2003. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1259-1262.
- Nakamoto, S., 1998. Promotion of chlamydoconidium formation in *Candida albicans* by corn meal broth incubation. *Medical Mycology* 36: 123-125.
- Odds F.C., 1988. *Candida* and candidosis, 2<sup>nd</sup> ed. Bailliere-Tindall, London.
- Odds F.C., 1994. Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of American Academy of Dermatology* 3: S2-S5.
- Pinjon, E, Sullivan D, Salkin D, Shanley, D. Coleman, 1998. Simple inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2093-2095.
- Spiegel, M., 2002. *Estadística*. 3ª Editorial Mc Graw-Hill, Madrid.
- Staib, P., J. Morschhäuser, 1999. Chlamidospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 521-524.
- Staib, P., J. Morschhäuser, 2005. Liquid growth conditions for abundant chlamydoconidia formation in *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 48: 50-54.
- Sullivan, D., D. Coleman, 1998. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 329-334.
- Sullivan, D., T. Westermeng, K. Haynes, D. Bennett, D. Coleman, 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507-21.
- Zavalza-Stiker, A., B. Ortiz-Saldivar, M. García-Hernández, M. Castillo-Casanova, A. Bonifaz, 2006. Rapid production of *Candida albicans* chlamydoconidia in liquid media under various incubation conditions. *Japan Journal of Medical Mycology* 47: 231-234.