

Identificación de *Candida glabrata* y otras especies comunes del género *Candida* mediante el uso secuencial del medio de cultivo cromógeno y la prueba del tubo germinal

Johan Sebastián Hernández-Botero^{1,2}, Jorge Enrique Pérez- Cárdenas³

RESUMEN

Introducción: se han usado agar cromógeno (AC) y la prueba del tubo germinal (PTG) para identificar *C. albicans*. Sin embargo, ninguna de estas dos pruebas por separado permite la identificación de *C. glabrata*.

Objetivo: analizar la eficacia diagnóstica del uso secuencial del AC y la PTG para identificar las especies más comunes de *Candida*.

Métodos: se identificaron 436 aislamientos usando el AC y luego la PTG; se utilizaron las pruebas bioquímicas como estándar de oro, y se determinaron la sensibilidad y especificidad del esquema secuencial con sus intervalos de confianza.

Resultados: el uso en serie del AC y la PTG tuvo sensibilidad del 97,9 % (IC95 %: 96,0-99,9) para identificar *C. albicans/dubliniensis* y del 90,9 % (IC95 %: 84,0-97,8) para identificar *C. tropicalis*, con especificidad del 100 % para ambas especies. El mismo esquema permitió identificar *C. glabrata* con sensibilidad del 92,5 % (IC95 %: 86,2- 98,8) y especificidad del 96,6 % (IC95 %: 95,0-98,6), y el complejo *C. parapsilosis* con especificidad del 96,3 % (IC95 %: 94,5-98,1).

Conclusiones: el esquema propuesto permite la identificación de *C. albicans/dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* con sensibilidad y especificidad adecuadas, y podría ser útil en entornos clínicos de bajos recursos.

PALABRAS CLAVE

Candida Glabrata; Candida Albicans; Candida Tropicalis; Identificación de Especies

¹ Médico Cirujano, Magíster en Ciencias Biomédicas. Docente del Programa de Medicina, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas y del Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Manizales, Colombia.

² Departamento de Ciencias Básicas Biológicas, Universidad Autónoma de Manizales, Colombia.

³ Profesor Titular. Facultad de Ciencias para la Salud, Área de Microbiología e Inmunología, Departamento de Ciencias Básicas para la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

Correspondencia: Johan Sebastián Hernández Botero; johanhdz03@hotmail.com

Recibido: septiembre 23 de 2014

Aceptado: febrero 20 de 2015

Cómo citar: Hernández-Botero JS, Pérez-Cárdenas JE. Identificación de *Candida glabrata* y otras especies comunes del género *Candida* mediante el uso secuencial del medio de cultivo cromogénico y la prueba del tubo germinal. *Iatreia*. 2015 Oct-Dic;28(4):(355-367). DOI 10.17533/udea.iatreia.v28n4a01.

SUMMARY

Identification of *Candida glabrata* and other common *Candida* species using chromogenic agar and germ tube test

Introduction: Chromogenic agar and germ tube test have been used for decades to identify *C. albicans*. However, neither of these tests separately allows identification of *C. glabrata*.

Objective: To test the efficacy of chromogenic agar and germ tube test used serially to identify the most common *Candida* species found in clinical practice, with emphasis on *C. glabrata*.

Methods: 436 isolates were identified using the chromogenic medium followed by the germ tube test. Biochemical tests were used as gold standard. Sensitivity, specificity and confidence intervals (95 %) of the serial identification system were determined.

Results: Sensitivity was 97.9 % (IC95 %: 96.0-99.9) to identify *C. albicans/dubliniensis*, and 90.9 % (IC95 %: 84.0-97.8) for *C. tropicalis*; specificity was 100 % for both species. Sensitivity was 92.5 % (IC95 %: 86.2-98.8) for identification of *C. glabrata* with 96.6 % (IC95 %: 95.0- 98.6) specificity. Concerning identification of the *C. parapsilosis* complex, specificity was 96.3 % (IC95 %: 94.5-98.1).

Conclusion: The proposed serial scheme has adequate sensitivity and specificity for identification of *C. albicans/dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*. It could be useful in low-resources clinical settings.

KEY WORDS

Candida glabrata; *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Species identification*

RESUMO

Identificação de *Candida glabrata* e outras espécies comuns do gênero *Candida* mediante o uso sequencial do meio de cultivo cromogênico e a prova do tubo germinal

Se usaram agar cromogênico (AC) e a prova do tubo germinal (PTG) para identificar *C. albicans*. No entanto, nenhuma destas duas provas por separado permitiu a identificação de *C. glabrata*.

Objetivo: analisar a eficácia diagnóstica do uso sequencial do AC e a PTG para identificar as espécies mais comuns de *Candida*.

Métodos: identificaram-se 436 isolamentos usando o AC e depois a PTG; utilizaram-se as provas bioquímicas como padrão de ouro, e se determinaram a sensibilidade e especificidade do esquema sequencial com seus intervalos de confiança.

Resultados: o uso em série do AC e a PTG teve sensibilidade de 97,9 % (IC95 %: 96,0-99,9) para identificar *C. albicans/dubliniensis* e de 90,9 % (IC95 %: 84,0-97,8) para identificar *C. tropicalis*, com especificidade de 100 % para ambas espécies. O mesmo esquema permitiu identificar *C. glabrata* com sensibilidade de 92,5 % (IC95 %: 86,2- 98,8) e especificidade de 96,6 % (IC95 %: 95,0-98,6), e o complexo *C. parapsilose* com especificidade de 96,3 % (IC95 %: 94,5-98,1).

Conclusões: o esquema proposto permite a identificação de *C. albicans/dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* com sensibilidade e especificidade adequadas, e poderia ser útil em meios clínicos de baixos recursos.

PALAVRAS CHAVES

Candida Albicans; *Candida Glabrata*; *Candida Tropicalis*; *Identificação de Espécies*

INTRODUCCIÓN

La identificación rápida y correcta de las especies del género *Candida* es fundamental en la práctica clínica para guiar la elección del tratamiento antimicótico del paciente con candidiasis (1). Por esta razón, se ha tratado de encontrar métodos de diagnóstico para lograr, lo más tempranamente posible, una identificación hasta el nivel de especie, en particular para las formas invasivas de la enfermedad (2). Los medios cromógenos, introducidos durante los años noventa, permitieron diferenciar *C. albicans* de otras especies del género y han demostrado ser, tras casi dos décadas de uso, una herramienta rápida y eficaz para su identificación (3-6). Con la inclusión de nuevos sustratos en la siguiente generación de medios se apuntó a identificar especies diferentes de *C. albicans*, y con ellos se ha logrado un éxito relativo en la identificación de especies como *C. krusei* y *C. tropicalis* (7-12). Sin embargo, especies frecuentes como *C. glabrata* y

C. parapsilosis siguen siendo difíciles de identificar satisfactoriamente con estos medios (5,7,8,11,12). Por otra parte, se ha demostrado que la prueba del tubo germinal (PTG), usada por décadas para identificar *C. albicans*, es sencilla, rápida, económica y eficaz para la determinación presuntiva de dicha especie (13-17). Sin embargo, otros patrones morfológicos en esta prueba como la ausencia total de filamentos por parte de *C. glabrata* en cualquier medio, o la presencia de pseudohifas asociada a *C. tropicalis* y al complejo *C. parapsilosis*, han sido poco explorados como herramienta de identificación debido a que los comparten varias especies (16,18-20). Las limitaciones de estas dos pruebas han restringido el uso de estos métodos de identificación presuntiva a la diferenciación entre *C. albicans* y las especies no-*albicans*; tal situación obliga a utilizar pruebas bioquímicas costosas, o a recurrir a métodos demorados de identificación morfológica como el agar harina de maíz, para poder clasificar al nivel de especie hasta un 50 % de los aislamientos. En el presente estudio se analizó la eficacia diagnóstica de la PTG y el medio cromógeno, utilizados de forma secuencial, para la identificación de las especies más comunes de *Candida* en la práctica clínica, con énfasis en la identificación de *C. glabrata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el marco de un estudio observacional en el que se evaluó la frecuencia de especies de *Candida* en población inmunocompetente mayor de 60 años, al ingreso a la unidad de cuidados intensivos (UCI); durante este estudio se planeó, a manera de trabajo paralelo, un análisis de identificación que se llevó a cabo utilizando todas las levaduras recolectadas durante el estudio clínico. Dichas levaduras se aislaron de diferentes muestras de vigilancia clínica: orofaringe, jugo gástrico, tráquea, orina e hisopado rectal. Una vez en el laboratorio, cada muestra se sembró en el medio cromógeno *Brilliance™ Candida Agar* (BCA), (Oxoid, UK); al cabo de 24 a 48 horas se hizo la lectura del cultivo y se clasificó el crecimiento de acuerdo con el color de las colonias, según el esquema de identificación de especies establecido por el fabricante del medio: **verde**: *C. albicans/dubliniensis*; **azul**: *C. tropicalis*; **café/beis**: *C. glabrata*, *C. kefyr*; complejo *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*; **morado**: *C. krusei*, aunque el fabricante declara en el

inserto del producto que esta última especie puede en ocasiones dar colonias de color café/beis (11,21). A cada uno de los aislamientos obtenidos del agar cromógeno se le hizo la prueba del tubo germinal; para ello se inocularon directamente dos colonias del medio cromógeno en 300 μ L de suero humano que se incubó a 37 °C por 2 horas; se seleccionaron este medio y dicho tiempo de incubación debido a su mejor relación entre sensibilidad y especificidad (16). Con el fin de evitar sesgos en la identificación, el investigador que leía dicha prueba no conocía el resultado obtenido en el medio cromógeno; además, durante todo el estudio se usó suero del mismo donante sano. La lectura se efectuó con objetivo de 40X en un microscopio Leica DM 500 con cámara, y se buscó alguno de los siguientes patrones morfológicos: 1) *presencia de tubos germinales*: blastoconidias con prolongaciones angostas, no septadas en su origen, típicas de *Candida albicans/dubliniensis* (20); 2) *presencia de pseudohifas*: blastoconidias acompañadas de prolongaciones que se inician desde un septo, las cuales exhiben una relación mayor entre el ancho y el largo que las hifas o tubos germinales; además, presentan múltiples constricciones septadas y se pueden observar como una secuencia de blastoconidias gemantes no separadas. Este patrón se asocia con la especie *C. tropicalis* y el complejo *C. parapsilosis* (16,19,22,23); 3) *ausencia de cualquier tipo de filamentosación* en cuyo caso se diferencian dos patrones: a) *blastoconidias pequeñas (menores de 5 μ M) redondas y uniformes*, características de *C. glabrata* (18,20); b) *blastoconidias normales a grandes, ovaladas o pleomórficas*: este patrón no se asocia con ninguna especie en particular. Posteriormente, se sembró cada uno de los aislamientos en agar de papa y dextrosa (PDA) (Scharlau, Scharlab S.L, Barcelona, España) a 37 °C por 24 horas con el fin de obtener suficientes colonias para la identificación definitiva por pruebas bioquímicas; con este propósito se empleó el estuche *Rapid ID YeastPlus* (Remel, Lenexa, KA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

ESQUEMA DE IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL CON MEDIO CROMÓGENO BCA Y PRUEBA DEL TUBO GERMINAL

Con base en el color de las colonias en el medio cromógeno y en el patrón morfológico en la prueba

del tubo germinal, se diseñó un esquema secuencial que utiliza ambos resultados para identificar algunas de las especies más comunes de *Candida*: 1) *C. albicans/dubliniensis*: presencia de tubo germinal en PTG y colonias de color verde en el medio BCA (11,16). La PTG y los medios cromógenos no son capaces de discriminar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (24), por lo que no se incluyó la diferenciación de estas dos especies en el presente trabajo. 2) *C. tropicalis*: presencia de pseudohifas en la PTG y colonias de color azul a las 48 horas de cultivo en el medio BCA (11,16,23). 3) *C. glabrata*: un cultivo cromógeno café/beis y ausencia completa de filamentación en la PTG con presencia de levaduras pequeñas (menores de 5 μ M) ovaladas y uniformes (11,18,19,23). 4) Complejo *C. parapsilosis*: colonias de color café/beis en presencia de pseudohifas en la PTG. Por su irrelevancia clínica, no se pretendió diferenciar las especies del complejo *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (11,19,23,25,26). 5) *C. krusei*: en el presente estudio solo se utilizó para su identificación la presencia de colonias moradas en el medio cromógeno BCA. No se tuvo en cuenta la PTG debido a que esta levadura no posee un patrón distintivo en dicha prueba y su frecuencia de filamentación es muy variable (11,16,19,20). Cada una de las levaduras aisladas en el estudio se almacenó en la colección de microbiología del laboratorio BIOSALUD a -80 °C, en una solución de Sabouraud líquido con dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10 %, para posteriores ensayos y análisis de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio (27).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron las recomendaciones para un estudio de diagnóstico en enfermedades infecciosas del panel TDR (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, ONU-WHO-World Bank), en su documento de 2010: *Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles* (28). La capacidad discriminatoria para la especie *C. albicans/dubliniensis* es la informada más consistentemente en la literatura, con sensibilidad y especificidad del 95 % y amplitud de intervalo de confianza de ± 5 % para ambas pruebas de identificación; teniendo en cuenta que en la mayoría de muestreos esta especie representa alrededor del 50 % de los aislamientos, el "n"

calculado sería una muestra aleatoria de 146 levaduras (11,16). Sin embargo, se decidió no limitar el número de muestras para el análisis y utilizar la totalidad de los aislamientos para así preservar la proporción de especies no-*albicans*, tener la mayor diversidad posible de especies y ofrecer intervalos de confianza (IC95 %) lo más estrechos posible, especialmente para las especies no-*albicans/dubliniensis*.

Con los resultados de las tres pruebas se construyeron tablas de contingencia para determinar la sensibilidad y especificidad con sus respectivos IC95 % (5,29-31). Para cada uno de estos indicadores se calculó un IC para una proporción derivada de una muestra simple; en los resultados que presentaron una característica operativa con un valor muy cercano al 0 % o al 100 % se calculó el IC de una distribución binomial para evitar que sobrepasara el límite del rango (31-33). No se calcularon los valores predictivos (negativo o positivo) de las pruebas, conforme a lo especificado por el panel TDR; dichos valores se reservan para estudios prospectivos en los que se evalúa la probabilidad de padecer o no la enfermedad a la luz del resultado de la prueba diagnóstica; a este respecto, los resultados de identificación del presente estudio se comportan como datos retrospectivos y las muestras se deben analizar como una colección de aislamientos (28). Tampoco se evaluó la reproducibilidad de la prueba debido a la limitación de tener dos observadores distintos durante todo el proceso de identificación, así como por la limitación de reactivos para repetir los ensayos.

RESULTADOS

Se utilizaron 436 levaduras para el proceso de identificación. La mayoría de los cultivos se leyeron a las 24 horas de crecimiento, pero los aislamientos de color azul o morado (23 %) fueron leídos a las 48 horas de acuerdo con las indicaciones del fabricante; ningún aislamiento requirió mayor tiempo para su identificación. La distribución de especies tras el muestreo, de acuerdo con las pruebas bioquímicas, se presenta en la tabla 1. Las especies *C. albicans/dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, el complejo *C. parapsilosis* y *C. krusei* representaron el 89,2 % de los aislamientos; hubo 14 aislamientos (3,2 %) de especies distintas al género *Candida*.

Tabla 1. Distribución de las especies de levaduras aisladas de acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas

Género	Especie	Frecuencia	%
Candida	<i>Candida albicans</i>	194	44,5
	<i>Candida glabrata</i>	67	15,4
	<i>Candida tropicalis</i>	66	15,1
	<i>Candida krusei</i>	33	7,6
	Complejo <i>Candida parapsilosis</i>	29	6,7
	<i>Candida famata</i>	11	2,5
	<i>Candida lusitaniae</i>	5	1,1
	<i>Candida spp.</i>	5	1,1
	<i>Candida dubliniensis</i>	4	0,9
	<i>Candida guilliermondii</i>	3	0,7
	<i>Candida kefyri</i>	2	0,5
	<i>Candida intermedia</i>	1	0,2
	<i>Candida pelliculosa</i>	1	0,2
	<i>Candida zeylanoides</i>	1	0,2
	Diferente de Candida	<i>Trichosporon spp.</i>	3
<i>Rhodotorula spp.</i>		3	0,7
<i>Hanseniaspora spp.</i>		2	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		2	0,5
<i>Cryptococcus spp.</i>		2	0,5
<i>Prototheca zopfii</i>		1	0,2
<i>Geotrichum capitatum</i>		1	0,2
Total		436	100,0

En la tabla 2 se presentan los resultados de identificación en el medio cromógeno en comparación con las pruebas bioquímicas.

Con colonias verdes, se clasificaron 198 aislamientos como *C. albicans/dubliniensis*, no se observaron falsos negativos y solo hubo seis falsos positivos (2,9 %), cuatro de los cuales correspondían a *C. tropicalis*. Como se observa en la tabla 4, la sensibilidad y especificidad estuvieron por encima del 97 %; asimismo, al evaluar la precisión, ninguno de los IC para estas dos características fue inferior al 95 %. Una eficacia similar presentaron las colonias de color azul en el medio BCA para identificar los 66 aislamientos de *C. tropicalis*. Se presentaron cuatro falsos negativos (6,1 %) debido al color verde de las colonias; siete aislamientos con colonias azules fueron falsos positivos: dos de *C. famata* y cinco de especies de levaduras diferentes del género *Candida*. Como se observa en la tabla 4, los indicadores de eficacia diagnóstica para la identificación de

C. tropicalis en el medio BCA fueron: sensibilidad 93,9 % y especificidad 98,1 %; de igual forma, al evaluar la precisión de los resultados ninguno de los límites inferiores del IC para todas las características estuvo por debajo del 88 %. Varias especies presentaron el color café/beis de las colonias en el medio BCA: *C. glabrata* (n = 63), complejo *C. parapsilosis* (n = 28), *C. krusei* (n = 21), *C. famata* (n = 8), *C. lusitaniae* (n = 5), *C. guilliermondii* (n = 3), *C. kefyri* (n = 1), *C. pelliculosa* (n = 1) y *C. zeylanoides* (n = 1), además de dos aislamientos de levaduras de géneros diferentes a *Candida*. La presencia de colonias moradas en el medio BCA es presuntiva de *C. krusei* (n = 33); sin embargo, para este color de colonia, se evidenció un alto porcentaje de falsos negativos (63,6 %) con 21 cepas de *C. krusei* descartadas de forma errónea por presentar colonias de color café. Como se puede observar en la tabla 4, la sensibilidad fue del 36,4 % y la especificidad estuvo por encima del 97,3 %, con IC95 % de 95,7 %-98,9 %.

Tabla 2. Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas frente al tubo germinal y el agar cromógeno para la identificación de especies de *Candida*

Especie definitiva (prueba bioquímica)	Color de las colonias en el BCA (%)				Patrón morfológico en la PTG (%)				TOTAL
	Azul	Café/beis	Morado	Verde	No filamentos (levaduras pleomórficas normales/grandes)	No filamentos (levaduras pequeñas)	Presencia de pseudohifas	Presencia de tubo germinal	
<i>C. albicans/C. dubliniensis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	198 (100)	2 (1)	0 (0)	2 (1)	194 (98)	198
<i>C. glabrata</i>	0 (0)	63 (94)	4 (6)	0 (0)	4 (6)	62 (92,5)	1 (0,5)	0 (0)	67
<i>C. tropicalis</i>	62 (93,9)	0 (0)	0 (0)	4 (6,1)	3 (4,5)	0 (0)	62 (93,9)	1 (1,5)	66
<i>C. krusei</i>	0 (0)	21 (63,6)	12 (36,4)	0 (0)	16 (48,5)	6 (18,2)	11 (33,3)	0 (0)	33
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	0 (0)	28 (96,6)	1 (3,4)	0 (0)	10 (34,5)	1 (3,4)	18 (62,1)	0 (0)	29
<i>C. famata</i>	2 (18,2)	8 (72,7)	1 (9,1)	0 (0)	6 (54,5)	4 (36,4)	1 (9,1)	0 (0)	11
<i>C. lusitanae</i>	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)	3 (60)	0 (0)	5
<i>C. guilliermondii</i>	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	3
<i>C. kefyr</i>	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2
<i>C. intermedia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
<i>C. pelliculosa</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
<i>Candida</i> spp.	0 (0)	4 (80)	0 (0)	1 (20)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5
Género diferente a <i>Candida</i>	5 (35,7) ^(a)	2 (14,3) ^(a)	4 (28,6) ^(a)	0 (0) ^(a)	14 (85,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14
TOTAL	69	137	23	204	65	74	102	195	436

NOTA: los 14 aislamientos de géneros diferentes a *Candida* fueron: 3 de *Trichosporon* spp., 2 de *Hanseniaspora* spp., 2 de *Saccharomyces cerevisiae*, 2 de *Cryptococcus* spp., 1 de *Prototheca zopfii*, 1 de *Geotrichum* spp., y 3 de *Rhodotorula* spp.^(a) Las colonias de este último género (*Rhodotorula* spp.) son de color rojo, por lo que no se tienen en cuenta en el conteo del medio cromógeno. BCA = medio de cultivo cromógeno *Brilliance™ Candida Agar*. PTG = prueba de tubo germinal

Tabla 3. Identificación de aislamientos de *Candida* spp., mediante el uso en serie del medio cromógeno BCA y la prueba del tubo germinal

Especie definitiva (prueba bioquímica)	Color de colonias en BCA y morfología en la PTG (%)					TOTAL
	<i>C. albicans/C. dubliniensis</i> ^(a)	<i>C. glabrata</i> ^(b)	Complejo <i>C. parapsilosis</i> ^(c)	<i>C. tropicalis</i> ^(d)	Indeterminado	
<i>C. albicans/C. dubliniensis</i>	194 (97,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2,1)	198
<i>C. glabrata</i>	0 (0)	62 (92,5)	2 (3)	0 (0)	3 (4,5)	67
<i>C. tropicalis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	60 (90,9)	6 (9,1)	66
<i>C. krusei</i>	0 (0)	6 (18,2)	7 (21,2)	0 (0)	20 (60,6)	33
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	0 (0)	1 (3,4)	18 (62,1)	0 (0)	10 (34,5)	29
<i>C. famata</i>	0 (0)	3 (27,3)	1 (9,1)	0 (0)	7 (63,6)	11
<i>C. lusitaniae</i>	0 (0)	0 (0)	3 (60)	0 (0)	2 (40)	5
<i>C. guilliermondii</i>	0 (0)	0 (0)	1 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)	3
<i>C. kefyr</i>	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	2
<i>C. intermedia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1
<i>C. pelliculosa</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
<i>C. zeylanoides</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1
<i>Candida</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	5
Géneros diferente a <i>Candida</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (100)	14
TOTAL	194	73	33	60	76	436

^(a) *C. albicans*: tubo germinal + colonias de color verde. ^(b) *C. glabrata*: levaduras pequeñas que no filantan + colonias café/beis. ^(c) Complejo *C. parapsilosis*: pseudohifas + colonias café/beis. ^(d) *Candida tropicalis*: presencia de pseudohifas + colonias azules. BCA = medio de cultivo cromógeno *Brilliance™ Candida Agar*. PTG = prueba de tubo germinal

Tabla 4. Eficacia diagnóstica del medio cromógeno y la prueba del tubo germinal frente a las pruebas bioquímicas en la identificación de diferentes especies de *Candida*

Especie	Prueba diagnóstica	Sensibilidad (%)	Intervalo de confianza 95%	Especificidad (%)	Intervalo de confianza 95%
<i>C. albicans/C. dubliniensis</i>	BCA	100,0	99,0-100,0	97,5	95,5-99,5
	PTG	98,0	96,0-99,9	99,6	98,8-100,0
	BCA + PTG	98,0	96,0-99,9	100,0	99,0-100,0
<i>C. tropicalis</i>	BCA	93,9	88,2-99,7	98,1	96,7-99,5
	PTG ^a	-	-	-	-
	BCA + PTG	90,9	84,0-97,8	100,0	99,0-100,0
<i>C. glabrata</i>	BCA ^b	-	-	-	-
	PTG	-	-	-	-
	BCA + PTG	92,5	86,2-98,8	96,6	95,0-98,6
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	BCA ^b	-	-	-	-
	PTG ^a	-	-	-	-
	BCA + PTG	62,1	44,4-79,7	96,3	94,5-98,1
<i>C. krusei</i>	BCA	36,4	19,9-52,8	97,3	95,7-98,9

Notas: BCA = medio de cultivo cromógeno *Brilliance™ Candida Agar*. PTG = prueba del tubo germinal

^a No se calculó la eficacia diagnóstica de la PTG para esta especie, porque comparte con otras especies la presencia de pseudohifas

^b No se puede calcular la eficacia diagnóstica del BCA para esta especie, porque el color café/beis lo comparte con otras tres especies

La distribución de los resultados de la PTG frente a las pruebas bioquímica se muestra en la tabla 2 y la apariencia de los patrones morfológicos se presenta en la figura 1. Los resultados de la eficacia diagnóstica de la detección de tubos germinales (PTG) para la identificación de *C. albicans/dubliniensis* (n = 198) se muestran en la tabla 4. El porcentaje de falsos negativos fue del 2 % y el de falsos positivos, del 0,4 %; la sensibilidad fue del 98 % y la especificidad del 99,6 % y ninguno de los límites inferiores del IC95 % estuvo por debajo del 96 %. El hallazgo de pseudohifas en la PTG se asocia a diferentes especies de *Candida*. Como se observa

en la tabla 3, el 93,9 % de las cepas de *C. tropicalis* (n = 62) y el 62,1 % de las del complejo *C. parapsilosis* (n = 18) presentaron pseudohifas en la PTG; ambas especies representaron, con 80 aislamientos, el 78,4 % de levaduras con pseudohifas en la PTG. Otras especies que presentaron pseudohifas fueron *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*. El patrón morfológico en la PTG de blastoconidias pequeñas y uniformes sin evidencia alguna de filamentación lo presentaron 74 aislamientos, a saber: 62 de *C. glabrata* (83,8 %), 6 de *C. krusei* (8,1 %), 4 de *C. famata* (5,4 %) y 2 (2,7 %) de especies diferentes al género *Candida*.

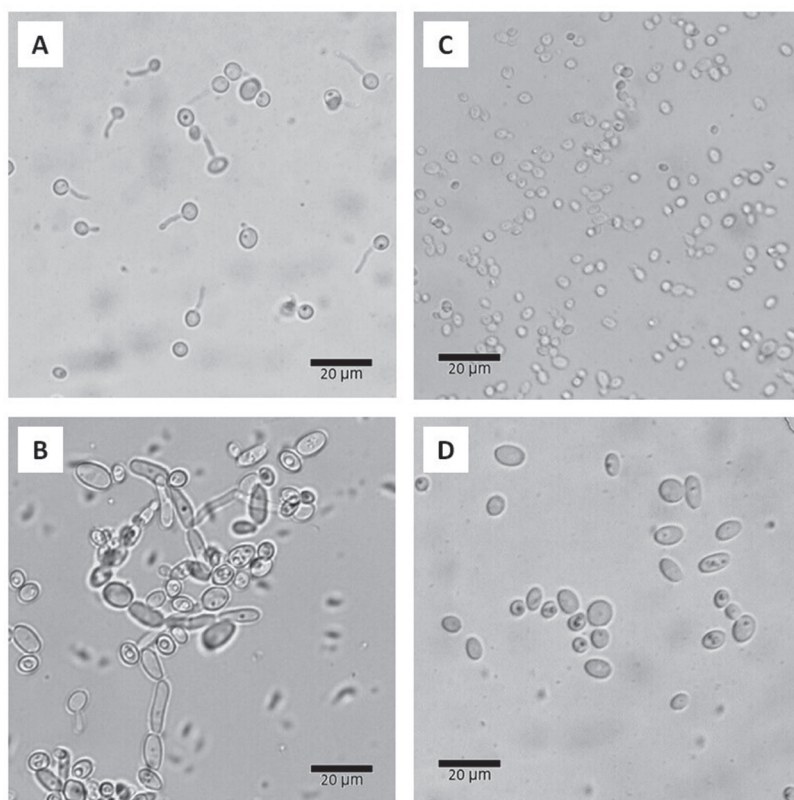


Figura 1. Patrones morfológicos en la prueba del tubo germinal

Las imágenes se tomaron con microscopio Leica DM 500 con cámara digital incorporada, usando el objetivo de 40X. **A) Tubo germinal:** se observan blastoconidias redondeadas con prolongaciones angostas, no septadas. Corresponde a un aislamiento de *C. albicans*. **B) Pseudohifas:** se observan múltiples blastoconidias grandes, ovaladas con prolongaciones que se inician desde un septo. Estas prolongaciones, o pseudohifas, son más anchas que las hifas verdaderas o tubos germinales; además, presentan múltiples constricciones septadas y se pueden observar como una secuencia de blastoconidias gemantes no separadas. Esta imagen corresponde a un aislamiento de *C. tropicalis*. En las dos imágenes siguientes se observan blastoconidias con ausencia total de tubos germinales o pseudohifas; se diferencian dos patrones de no filamentación: **C) Blastoconidias pequeñas (< 5 µm)** redondas y uniformes; este aislamiento corresponde a *C. glabrata*. **D) Blastoconidias normales a grandes:** patrón que no se asocia con ninguna especie en particular. Este aislamiento corresponde al complejo *C. parapsilosis*

Los resultados de la identificación de aislamientos de *Candida* mediante el uso secuencial del medio BCA y la PTG están en la tabla 3 y los de la eficacia diagnóstica, en la tabla 4. La identificación de *C. albicans/dubliniensis* (n = 198) mediante este esquema en serie presentó cuatro falsos negativos y no tuvo falsos positivos; por lo tanto, la especificidad aumentó entre 0,4 % y 2,5 % a expensas de la sensibilidad, que disminuyó un 2 % respecto al medio cromógeno. La identificación de *C. tropicalis* (n = 66) mediante el esquema conjunto presentó seis falsos negativos y ningún falso positivo; por lo tanto, al comparar con el desempeño del medio BCA solo la especificidad aumentó 2 %, a expensas de la sensibilidad que disminuyó 3 %. El esquema propuesto de identificación en serie tuvo sensibilidad del 92,5 % (IC95 %: 86,2-98,8) y especificidad del 96,6 % (IC95 %: 95-98,6) para la identificación de *C. glabrata*. Se observó un 7,5 % de falsos negativos debidos principalmente a errores en la estimación visual del tamaño de las blastoconidias; la proporción de falsos positivos identificados como *C. glabrata* fue del 3,4 %; las especies que más se confundieron con

ella fueron *C. krusei* con la mitad de los falsos positivos y *C. famata* con un cuarto de los mismos. La identificación del complejo *C. parapsilosis* (n = 29) mediante el esquema conjunto de colonias café y pseudohifas tuvo especificidad del 96,3 % (IC95 %: 94,5-98,1) y sensibilidad del 62,1 % (IC95 %: 44,4- 79,7).

En la tabla 5 se resume la distribución de los aislamientos diferentes del género *Candida* de acuerdo con la especie identificada (pruebas bioquímicas) y el resultado del medio BCA y la PTG. En total, los 14 aislamientos diferentes al género *Candida* representaron el 3,2 % del total analizado en el estudio. Solo en tres de los siete géneros aislados se pudo llegar hasta definir la especie, porque la identificación a este nivel exige métodos no convencionales que no se incluyeron en este trabajo. Con frecuencia se informan especies de los géneros *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces* spp., y *Rhodotorula* spp., como parte de la microbiota humana, sea de forma transitoria o permanente, y estos fueron, aparte de *Candida*, los géneros más frecuentes en el presente estudio.

Tabla 5. Identificación de levaduras diferentes al género *Candida* aisladas de pacientes adultos mayores al ingreso a la unidad de cuidados intensivos

Prueba bioquímica	Cultivo polifúngico	Cromo	PTG - Observaciones
<i>Cryptococcus albidus</i>	Sí: CP, CA	Morado	Blastoconidias normales redondas sin filamentación
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Sí: CP, CA	Azul	Blastoconidias normales ovoides gemantes sin filamentación
<i>Geotrichum capitatum</i>	Sí: CA	Café	Presencia de artroconidias, al directo. Ureasa (-). No filamentación en PTG
<i>Hanseniaspora</i> spp.	Sí: CK, CA	Azul	Blastoconidias pequeñas ovaladas en forma de limón, no filamento
	No	Morado	Blastoconidias pequeñas ovaladas en forma de limón, no filamento
<i>Prototheca zopfii</i>	Sí: CG	Azul	Células grandes y ovaladas con septos, no hay filamentación
	NO	Rojo	Blastoconidias normales a grandes sin hifas o pseudohifas
<i>Rhodotorula</i> spp.	Sí: CP	Rojo	Blastoconidias normales a grandes sin hifas o pseudohifas
	No	Rojo	Blastoconidias normales a grandes sin hifas o pseudohifas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sí: CA	Morado	Blastoconidias grandes, sin filamentación
	Sí: CT, CK	Morado	Blastoconidias grandes, sin filamentación.
<i>Trichosporon</i> spp.	No	Café	Blastoconidias ovaladas. Al directo: presencia de artroconidias. Ureasa (+)
	No	Azul	Blastoconidias ovaladas. Al directo: presencia de artroconidias. Ureasa (+)
	No	Azul	Blastoconidias ovaladas. Al directo: presencia de artroconidias. Ureasa (+)

CA: *Candida albicans*. CT: *Candida tropicalis*. CG: *Candida glabrata*. CP: complejo *Candida parapsilosis*. CK: *Candida krusei*. PTG: descripción de la prueba del tubo germinal

Como se puede observar en la tabla 5, el color más frecuente de las colonias de aislamientos no-*Candida* en el medio BCA fue el azul con cinco, seguido del morado con cuatro, el rojo con tres y el café con dos. En la PTG la mayoría de estas especies presentaron patrones indistintos (blastoconidias grandes sin patrón de filamentación) o las características típicas de algunas especies (artróconidias en el caso de *Geotrichum capitatum* o blastoconidias en forma de limón asociadas con *Hanseniaspora* spp.).

DISCUSIÓN

En el presente estudio el medio cromógeno BCA y la prueba del tubo germinal (PTG) demostraron ser eficaces para la identificación de *C. albicans*/*C. dubliniensis*, pero, como se puede observar en la tabla 4, dicho medio fue más sensible y la PTG, más específica. El desempeño de cualquiera de las pruebas para la identificación de *C. albicans* es similar en términos de sensibilidad y especificidad a lo hallado en otros estudios: ambos parámetros logran discriminación por encima del 95 % (5,11,13,16). En el estudio multicéntrico de Alfonso y colaboradores (21), en el que se utilizó el mismo medio cromógeno BCA en una muestra de 240 aislamientos, se encontraron sensibilidad del 84 % y especificidad del 91,5 %, o sea, que la capacidad de discriminación fue inferior a la aquí mostrada. Asimismo, para la identificación de *C. tropicalis* usando el mismo medio cromógeno, en el presente estudio la sensibilidad (93,9 %) fue superior a la informada por Alfonso y colaboradores (61 %) y la especificidad fue igual a la hallada por estos autores (98,1 %) (21). Sin embargo, los valores de sensibilidad y especificidad encontrados en nuestro estudio fueron similares a los reportados con otros medios cromógenos (9,11).

El uso secuencial del medio BCA y la PTG presentó sensibilidad del 97,9 % para identificar *C. albicans*/*dubliniensis* y del 90,9 % para *C. tropicalis*, con especificidad del 100 % para ambas especies. Esto indica que dicho esquema diagnóstico secuencial es comparable en capacidad de discriminación al uso de cualquiera de los medios cromógenos habituales, pero con un aumento de la especificidad (5,6,8,29). Era de esperar la ausencia de falsos positivos ya que el aislamiento tendría que presentar el mismo error en las dos pruebas. Cabe resaltar que este no es el primer esquema

que trata de correlacionar dos pruebas de uso común. Koehler y colaboradores (23) en 1999 reportaron un esquema para identificar especies de *Candida* utilizando el medio CHROMagar *Candida* y el agar harina de maíz + tween [polisorbato] 80; a pesar de mencionar la eficacia del esquema hay que tener en cuenta dos elementos: en primer lugar, la interpretación de este esquema depende de cuánto tarde el crecimiento del cultivo en harina de maíz lo que duplica el tiempo de identificación comparado con el requerido para completar el esquema propuesto en el presente estudio. Segundo, el reporte de Koehler y colaboradores (23) no menciona ningún indicador que permita conocer la capacidad de discriminación de la prueba (sensibilidad y especificidad). En síntesis, el esquema propuesto demuestra que el uso en serie del medio cromógeno y la PTG aumenta la especificidad (a expensas de la sensibilidad), lo cual podría incrementar el valor predictivo positivo de la identificación de estas dos especies comunes, algo que debe ser comprobado en estudios prospectivos.

El medio BCA no resultó adecuado para identificar *C. krusei* debido a que solo una tercera parte de las colonias exhibió el color morado característico descrito por el fabricante; las restantes resultaron de color café/beis. Este hallazgo contrasta con los resultados de Ghelardi y colaboradores (11) y Alfonso y colaboradores (21) quienes reportaron sensibilidad por encima del 87 % para la identificación de esta especie. En el presente estudio no se encontró un patrón morfológico asociable a *C. krusei* en la prueba del tubo germinal, y se debe establecer, en un futuro ensayo, si la presencia de filamentación en tiempos de incubación mayores de 2,5 horas podría servir para identificar dicha especie, como lo sugirieron Hilmoglu y colaboradores (16). Asimismo, con una sensibilidad de 62 %, el esquema conjunto para la identificación del complejo *C. parapsilosis* no fue eficaz para descartar este grupo de especies debido a la presencia de 11 falsos negativos (38 %). Si bien, casi la totalidad de los aislamientos de esta especie son de color café en el medio cromógeno, la inconsistencia en la formación de pseudohifas y el hecho que este patrón morfológico sea compartido por otras especies explican la proporción de falsos negativos cercana al 40 %. Sin embargo, el hallazgo de pseudohifas en la PTG en presencia de colonias color café en el medio BCA tiene especificidad del 96 % para identificar el complejo

C. parapsilosis; el valor predictivo positivo de este hallazgo dependerá de la prevalencia de esta especie, que es más alta en la población adulta latinoamericana que en el resto del mundo (34,35).

La importancia de la identificación rápida de *C. glabrata* radica en que esta especie presenta sensibilidad disminuida a los azoles, es la especie que con mayor frecuencia exhibe susceptibilidad disminuida a las equinocandinas y su prevalencia ha venido aumentando entre las especies no-*albicans* responsables de candidemia, especialmente en la población adulta mayor (2,34,36-38). Se ha explorado poco para propósitos de identificación la ausencia de filamentación en presencia de blastoconidias pequeñas y uniformes como patrón morfológico típico de *C. glabrata* en cualquier medio de cultivo usual en la práctica clínica (18). Utilizando agar harina de maíz, Koehler y colaboradores (23) analizaron 116 aislamientos de esta especie y, según ellos, la ausencia de filamentación y la presencia de levaduras pequeñas (entre 2,5 y 4 μ M) son criterios esenciales para identificar esta especie; sin embargo, especies como *C. famata*, *C. krusei* y aislamientos diferentes al género *Candida* pueden presentar un patrón morfológico similar. En el presente estudio, este hallazgo en la PTG en presencia de colonias café en el medio BCA tuvo sensibilidad del 92,5 % (IC95 %: 86,2-98,8) y especificidad del 96,6 % (IC95 %: 95-98,6) para la identificación de *C. glabrata*. Entre los métodos rápidos y económicos para identificar esta especie se destaca el propuesto por Freydiere y colaboradores (39) en un estudio hecho en 2002; utilizando como marcador la actividad de la trehalasa describieron sensibilidad del 96,9 % y especificidad superior al 95 %. Sin embargo, el desempeño de dicha prueba dependía del medio de cultivo utilizado, no se reportó el IC95 % para sensibilidad-especificidad y se utilizó una proporción de *C. glabrata* (53 % del total de la muestra) que dista mucho de la encontrada en la práctica clínica diaria, detalle que aumenta ostensiblemente el valor predictivo positivo de la prueba y les resta validez externa a los resultados. No obstante, amerita comparar en un futuro estudio el desempeño de la prueba rápida de trehalasa con el esquema de identificación planteado en el presente artículo.

Con el esquema secuencial se pudieron descartar las especies de géneros diferentes a *Candida*, algo para tener en cuenta por parte de personas poco

experimentadas en la observación de las características morfológicas de las colonias como la consistencia o la forma. Así, se observa que las colonias azules, asociadas con *C. tropicalis*, se pueden confundir con aislamientos de los géneros *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Prototheca* spp., y *Hanseniaspora* spp. Sin embargo, mediante la PTG se descartaron estos falsos positivos ya que estas especies no producen el patrón de filamentación con pseudohifas que produce *C. tropicalis*. Las colonias de *Saccharomyces* spp., y *Hanseniaspora* spp., pueden ser de color morado, correspondiente a *C. krusei*; con esta especie no hay ningún patrón de filamentación en la PTG que permita diferenciarlas, más allá de la forma característica de las blastoconidias de *Hanseniaspora* spp. Por otra parte, los dos aislamientos que presentaron el patrón de blastoconidias pequeñas en la PTG no tuvieron colonias café en el medio BCA lo que evita clasificarlas erróneamente como *C. glabrata*.

En síntesis, el esquema aquí propuesto es una herramienta sencilla para identificar las tres especies más frecuentes que representan el 75 % de los aislamientos de *Candida* presentes en la población adulta mayor en UCI: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Debido a su carácter seriado, este esquema aumenta la especificidad de la identificación lo que podría mejorar el valor predictivo positivo respecto al uso individual de las pruebas en la práctica clínica. Ante la imposibilidad de identificar *C. glabrata* utilizando únicamente la prueba del tubo germinal o el medio cromógeno, el esquema de identificación en serie aquí propuesto ofrece sensibilidad del 92,5 % (IC95 %: 86,2-98,8) y especificidad del 96,6 % (IC95 %: 95-98,6) para su identificación. Tales elementos sugieren que este esquema podría ser útil en ambientes hospitalarios con recursos limitados que no cuenten con la posibilidad de hacer pruebas bioquímicas de identificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar;48(5):503-35. DOI 10.1086/596757.
2. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Sep;20(3):485-506.

3. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol*. 1994 Dec;32(12):3034-6.
4. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol*. 1996 Feb;34(2):454-6.
5. Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Martín-Mazuelos E, Negroni R. [Evaluation of a new chromogenic medium (Candida ID) for the isolation and presumptive identification of *Candida albicans* and other medically important yeasts]. *Rev Iberoamer Micol*. 2001 Mar;18(1):23-8. Spanish.
6. Contreras I, San-Millán R, Agustín-Barrasa A, Pontón J, Quindós G. Utility of Albicans ID plate for rapid identification of *Candida albicans* in clinical samples. *Rapid identification of Candida albicans*. *Mycopathologia*. 1996 Oct;136(1):17-20.
7. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996 Jan;34(1):58-61.
8. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3340-5.
9. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2003 Oct;2:8.
10. Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Nov;32(3):201-4.
11. Ghelardi E, Pichierrì G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Feb;14(2):141-7.
12. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006 Jan;5:1.
13. Griffin ER. The Value of the Germ Tube Production Test in the Rapid Identification of *Candida Albicans*. *J Med Lab Technol*. 1964 Oct;21:298-301.
14. Dolan CT, Ihrke DM. Further studies of the germ-tube test for *Candida albicans* identification. *Am J Clin Pathol*. 1971 Jun;55(6):733-4.
15. Mackenzie DW. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*. 1962 Nov;15(6):563-5.
16. Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses*. 2007 Jul;50(4):282-5.
17. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2008 Oct;46(10):3508-9. DOI 10.1128/JCM.01113-08.
18. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jan;12(1):80-96.
19. Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP. *Candida Berkhout (1923)*. In: Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 5^a ed. New York: Elsevier; 2011. p. 987-1278.
20. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, et al. Identificación por laboratorio de levaduras. En: Koneman EW, Allen S. *Diagnóstico Microbiológico*. 6^a ed. México: Panamericana; 2008. p. 1164-70.
21. Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone Mdel C, Guelfand L, Bianchi M, et al. [Presumptive identification of *Candida* spp. and other clinically important yeasts: usefulness of Brilliance Candida Agar]. *Rev Iberoam Micol*. 2010 Jun;27(2):90-3. DOI 10.1016/j.riam.2010.01.008. Spanish.
22. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004 Jul;12(7):317-24.
23. Koehler AP, Chu KC, Houang ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999 Feb;37(2):422-6.

24. Ells R, Kock JL, Pohl CH. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? *Mycoses*. 2011 Jan;54(1):1-16. DOI 10.1111/j.1439-0507.2009.01759.x.
25. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):284-92.
26. Trofa D, Gácsér A, Nosančuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):606-25. DOI 10.1128/CMR.00013-08.
27. Howell SA, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Vol 2. Washington: ASM Press; 2011. p. 1793-821.
28. TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel, Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12 Suppl):S17-29.
29. Cárdenes CD, Carrillo AJ, Arias A, Rodríguez-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, et al. Comparison of *Albicans* ID2 agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;42(3):181-5.
30. Bland M. *An introduction to medical statistics*. 2^a ed. London: Oxford University Press; 1995.
31. Altman D, Machin D, Bryant, Gardner M, editors. *Statistics with Confidence*. 2^a ed. London: BMJ Books; 2000.
32. Deeks JJ, Altman DG. Sensitivity and specificity and their confidence intervals cannot exceed 100%. *BMJ*. 1999 Jan;318(7177):193-4.
33. Harper R, Reeves B. Reporting of precision of estimates for diagnostic accuracy: a review. *BMJ*. 1999 May;318(7194):1322-3.
34. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Nov;68(3):278-83. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.015.
35. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):396-9. DOI 10.1128/JCM.01398-10.
36. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat*. 2011 Jun;14(3):164-76. DOI 10.1016/j.drug.2011.01.004.
37. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, et al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol*. 2006 Feb;55(Pt 2):223-8.
38. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. DOI 10.1371/journal.pone.0059373.
39. Freydière AM, Parant F, Noel-Baron F, Crepy M, Treny A, Raberin H, et al. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3602-5.

