

Página de Microbiología:

PRUEBAS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DE *Candida* EN CAVIDAD BUCAL

Guilarte, C. *; Pardi, G. **

*Profesor Asociado. Especialista en Micología Médica.

**Profesor Titular.

Cátedra de Microbiología. Facultad de Odontología. UCV.

Resumen: El objetivo de la siguiente revisión es dar a conocer las técnicas de identificación más comúnmente utilizadas para identificar las especies de *Candida* en cavidad bucal, entre ellas: 1. Estudio morfológico; 2. Pruebas rápidas; 3. Estudio fisiológico y bioquímico; 4. Métodos automatizados; 5. Medios diferenciales; 6. Métodos inmunológicos; 7. Biología molecular.

Palabras Claves: *Candida*, cavidad bucal, especies, pruebas de identificación.

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, pero solamente algunas de estas son patógenas para el hombre. Diversas especies pertenecientes al Género producen infecciones en la cavidad bucal, siendo *C. albicans* la especie más virulenta y la que se halla presente en la mayoría de los casos. No obstante, otras especies del Género *Candida* menos virulentas que *C. albicans*, también pueden encontrarse implicadas en procesos infecciosos de la cavidad bucal, entre estas: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, entre otras. Estas especies se caracterizan por ser células eucarióticas de forma levaduriformes o blastosporas, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. (1,2) La producción de factores de virulencia por parte de especies de *Candida* puede variar de acuerdo con el lugar y el grado de invasión, así como por la naturaleza de la respuesta del hospedero. (3)

La adherencia de especies de *Candida* a las células epiteliales bucales ha sido estudiada desde hace tiempo. En 1991, Calderone y Braun hacen referencia a diversos compuestos que permiten la unión de este hongo a células epiteliales, plaquetas de fibrina, células endoteliales y materiales plásticos. Algunas consideraciones a consecuencia de estos estudios, han emergido, a saber: 1) Existe una cierta jerarquía entre las distintas especies del Género *Candida* con respecto a las especies más virulentas como son *C. albicans* y *C. tropicalis*, las cuales se adhieren a las células hospederas in vitro, en mayor grado que aquellas especies relativamente poco virulentas como *C. krusei* y *C. guilliermondi*. 2) El medio donde ocurre el crecimiento, afecta profundamente la extensión de la adherencia in vitro de *C. albicans*, tanto a las células epiteliales como a las superficies plásticas. 3) Las cepas que reducen su habilidad para adherirse a diversas células in vitro también reducen su habilidad para causar infección in vivo en modelos animales. 4) El aumento de la adherencia in vitro está directamente relacionado con el aumento de la síntesis de una capa fibrilar que, en cierto modo, es comparable con las adhesinas de las fimbrias bacterianas. 5) Las formas filamentosas del hongo se adhieren en mayor grado a diversos sustratos que las formas de levadura. 6) La adhesina principal de *C. albicans* es una Manoproteína que conforma una capa de fibrillas (constituida aproximadamente por 85% de manosa), y cuya síntesis se incrementa en medios que contienen altas concentraciones de galactosa o sacarosa a 37° C. (4)

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para identificar las especies de *Candida*, los cuales varían en tiempo, especificidad, sensibilidad, costos, entre otros. (1,2) De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad. (5) Las técnicas de identificación más comúnmente utilizadas comprenden: 1. Estudio morfológico; 2. Pruebas rápidas; 3. Estudio fisiológico y bioquímico; 4. Métodos automatizados; 5. Medios diferenciales; 6. Métodos inmunológicos; 7. Biología molecular. Las tres primeras técnicas comprenden diversos ensayos, los cuales son referidos por lo general como pruebas convencionales rápidas de identificación. (2,6,7,8)

El estudio morfológico comprende la evaluación microscópica (presencia o ausencia de levaduras, hifas, pseudohifas, tubo germinal, clamidosporas) y macroscópica (color, aspecto, bordes y tamaño de las colonias) (6,7,8). El examen directo con solución salina y azul de lactofenol puede ser útil para el diagnóstico rápido de la candidiasis oral pseudomembranosa, pero las técnicas de cultivo suelen ser más sensibles, ya que la microscopía directa precisa de la existencia de un número significativo de levaduras. La tinción de Gram mejora la observación microscópica, pues pueden distinguirse más fácilmente las células levaduriformes (8,9). La producción del tubo germinal es una de las pruebas rápidas que nos orienta principalmente hacia la identificación de *C. albicans*. Se debe recordar que la especie *C. dubliniensis*, también produce tubo germinal en un corto período de tiempo. El ensayo se aplica colocando un pequeño inóculo de la levadura en suero humano, de conejo o ratón, clara de huevo o en solución proteica, por el lapso de 2-4 h a 37 °C, se induce el desarrollo de una estructura tubular a partir del blastoconidio, sin constricción en su base, característica que lo diferencia de una pseudohifa. Aunque es una prueba rápida, tiene el inconveniente de dar entre 5 a 10% de falsos negativos y positivos, además de requerir de buena experiencia técnica para su lectura. (6,7,9,10) La producción de clamidosporas, es otra prueba rápida que se utiliza para diferenciar *C. albicans* de las otras especies, teniendo en cuenta que *C. dubliniensis*, también forma clamidosporas en un lapso de 48 horas de incubación a temperatura ambiente, por lo que se requiere la aplicación de otros ensayos (fisiológicos, bioquímicos, moleculares) para diferenciar estas especies. Entre los medios empleados para inducir clamidosporas se encuentran corn-meal, leche, crema de arroz, bilis, harina de trigo, en donde se forman las vesículas de doble pared, producto del ensanchamiento celular por el proceso de almacenamiento de nutrientes, conocidas también como células de resistencia. (6,7,10)

Otras pruebas convencionales complementarias son indicadas para la diferenciación de especies de *Candida*, tales como: Urea que mide la capacidad de la levaduras de hidrolizar la molécula de urea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa; esto genera un incremento del pH del medio y en consecuencia el cambio de color de naranja a fucsia¹¹, siendo las especies de *Candida* negativas a este ensayo, salvo algunas excepciones, como *C. krusei*, la cual puede o no presentarla (10); Termotolerancia a 37°, 42° y 45°C, se ha descrito que *C. dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por ausencia de crecimiento a 45°C; sin embargo, hallazgos más recientes demuestran que algunos aislados de *C. dubliniensis* tienen capacidad de crecer a 42° y 45°C¹² y Resistencia a la Cicloheximida en medio mycosel. (6,7,10)

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas comprenden una serie de ensayos de asimilación (auxanograma-degradación aeróbica) y fermentación (zimograma-degradación anaeróbica) de carbohidratos para la identificación de levaduras. En el auxanograma, la asimilación del azúcar se detecta por el crecimiento visible y cambio del indicador de color en el medio de cultivo, mientras que en el zimograma, su producto se detecta a través de la producción de gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). El auxanograma se trata de un método muy poco utilizado actualmente, debido fundamentalmente a lo laborioso del mismo, por lo que se han comercializado algunos que facilitan la identificación de las levaduras. (6,7,10)

Los sistemas automatizados, son pruebas de identificación basados en ensayos de asimilación de carbohidratos y otras reacciones bioquímicas, los cuales se encuentran estandarizados y simplificados en forma de sustratos liofilizados. A diferencia de las pruebas convencionales, que pueden tomar entre 2-20 días, el sistema automatizado permite la identificación de la levadura en un lapso de 24-48 horas y los resultados pueden ser leídos en forma visual o automática a través de un Software. Entre estos sistemas podemos mencionar los sistemas: Auxacolor, Uni-Yest Tek, API 20 CAUX, Rapad Yeast Plus, Fusgiscren, API *Candida*, API-ATB, ID 32C, Vitek, Vitek 2, Biolo Y T Microplat Baxter MicroScan, Sensident. (8,10,13) Mendoza (2005), considera que estos sistemas automatizados deben ser complementados con el estudio morfológico, sobre todo en el caso de especies poco comunes. (6)

Los medios de cultivos diferenciales son métodos basados en la detección de actividad enzimática, que han sido desarrollados con mucho éxito en los últimos tiempos. Comprende una serie de medios de cultivo a los cuales se les ha adicionado sustratos cromogénicos o fluorogénicos, que ponen de manifiesto

la presencia o no de un grupo de enzimas del hongo. Los que utilizan sustratos fluorogénicos (necesitan de una lámpara de Wood para su lectura) detectan beta-galactosaminidasa y L-prolinaminopeptidasa o solamente beta-galactosaminidasa y los que utilizan sustratos cromogénicos detectan beta-galactosaminidasa y L-prolinaminopeptidasa). (6,9) Existen en el mercado una gran variedad de medios diferenciales que pueden diferir en cuanto a su sensibilidad, especificidad y costo, entre estos tenemos: CHROMagar *Candida*, Agar *Candida* Cromogénico, *Candida* ID, Albicans ID, Chromalbicans Agar, Chromogenic *Candida* Agar, Fluoroplate *Candida*, Agar SDCA-MUAG. (5,14,15,16,17,18,19)

El medio Chromagar *Candida* descrito por Odds. y Barnaerts en 1994, uno de los primeros en salir al mercado, ha mostrado un 100% de sensibilidad y especificidad en la identificación de *C. albicans* y *C. tropicalis* (20); también ha sido referido la identificación de *C. glabrata* y *C. krusei* (21). Entre otra de sus ventajas resalta su utilidad en la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, que desarrollan un color verde claro y verde oscuro respectivamente; similares resultados se han observado en el medio *Candida* ID. (22) Un nuevo medio cromógeno está disponible para la identificación rápida de las especies de *Candida* clínicamente importantes, el Agar *Candida* Cromogénico Oxoid (OCCA), es un medio diferencial selectivo que emplea dos cromógenos para la diferenciación de las colonias de *C. albicans* (verdes) de las de *C. tropicalis* (azul oscuro), *C. krusei* (rosado marrón), de otras especies importantes de *Candida* (colonias beige, amarillo y café), en una sola incubación. (23,24) Estos medios de cultivo diferenciales, a pesar de sugerir una identificación presuntiva, tienen la gran ventaja de no requerir mucha experiencia técnica, son rápidos y específicos, permiten identificar el agente a partir del cultivo primario y discriminan entre mezclas de levaduras de una misma muestra, sin embargo, sólo pueden identificar unas pocas especies y son menos específicos que las pruebas de asimilación de compuestos de carbono. (21,25) En Venezuela se describió por primera vez la especie *C. dubliniensis* por estudios de caracteres fenotípicos, los cuales incluyeron el empleo de medios cromogénicos y otros medios. (26) Sin embargo, Mesa y col. (2004) no encontraron buena correlación con estos medios para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. (27)

Los métodos inmunológicos, son una herramienta de gran valor que se basan en la detección de antígenos o anticuerpos a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en látex, ELISA. Hoy en día disponemos de pruebas comerciales rápidas y de fácil ejecución como: Bicho Látex Albicans, Bicho Látex Krusei, Bicho Látex Dubli, Krusei Color, *Candida* Check, Platelia *Candida* Ag, Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak, Anticuerpos antimicelo de *C. albicans*, *Glabrata* RTT. (6,28) Sin embargo, a pesar de la utilidad de este tipo de técnicas, prácticamente no se emplean para el diagnóstico de infecciones por *Candida* en cavidad buca. (8)

En los últimos años, los métodos de biología molecular se han aplicado al análisis de diferentes especies de *Candida*. La determinación del cariotipo mediante electroforesis de campo pulsátil (PFGE), la hibridación con sondas, la detección del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación del ADN (PCR, LCR) y posterior hibridación por Southern, son los más empleados para el estudio de las candidiasis orofaríngeas. (29,30,31,32)

El aislamiento de ADN geonómico es normalmente el primer paso para cualquier estudio en la manipulación del ADN in vitro. Este es un procedimiento largo y complicado, más aun si se toma en consideración que el ADN de los hongos no es una molécula libre sino que está ligada tanto al ARN como a un complejo de proteína (histonas y otras), además de estar usualmente rodeada de membranas celulares y complejas paredes. Este procedimiento comprende tres pasos esenciales: 1) La fragmentación o ruptura de las membranas y paredes del hongo para dejar libre el ADN de las proteínas y otros complejos proteicos. Como los hongos tienen una pared de quitina, manosa y glucán, la ruptura de la pared es un procedimiento necesario para obtener ADN. En el caso de las levaduras de *Candida* y otros unicelulares con pared, se lleva a cabo con métodos enzimáticos o por rupturas con perlas de vidrio; 2) La solubilización del ADN y disociación de los complejos ADN-proteínas llevados a cabo con detergentes, agentes proteolíticos o desnaturizantes; y 3) La separación del ADN de los complejos proteicos usando métodos de precipitación. Existen diferentes técnicas de biología molecular que son aplicables al estudio del ADN aislado de hongos levaduriformes. (29,30,31,32) A continuación se resumen las más

importantes:

El método de la Reacción de la Cadena de la polimerasa (RCP) es el método para amplificar *in vitro* fragmentos de ADN. La técnica de la RCP está basada en el uso de oligonucleótidos que actúan como iniciadores (primers). Estos iniciadores actualmente se mezclan con el ADN genómico (o cualquier otro ADN) en presencia de la ADN polimerasa termoestable conocida comercialmente como Taq polimerasa, aislada de un procarionte termofílico llamado *Thermus aquaticus*, la cual ha sido usada con éxito para amplificar regiones específicas del ADN. La especificidad de la reacción es preservada aun en complejas muestras de ácidos nucleicos, lo que garantiza un método poderoso para investigar ácidos nucleicos que se encuentran en pequeñas muestras clínicas. Debido a su alta especificidad, sensibilidad y a la facilidad de automatizar el procedimiento, la RCP ha emergido como una tecnología básica que ha abierto un sin número de campos en la biología molecular en el área de la micología. (31,32)

El uso de la técnica de Análisis con Enzimas de Restricción basada en el hecho de que existen enzimas que cortan el ADN en lugares específicos, ha sido aplicada para mapear un gen de interés o para conocer la variabilidad genética entre aislamientos de un mismo microorganismo recobrado en diferentes regiones o durante una epidemia. Su aplicación más inmediata es en estudios epidemiológicos en los cuales se analizan más de una cepa de un mismo microorganismo. (31,32)

También han sido descritos varios métodos de Clonación, los más usados son los que involucran la transfección de procariontes y eucariontes con plásmidos conteniendo el ADN en estudio. Algunos de ellos son solamente para estudiar el ADN clonado y otros para expresar la proteína codificada por ese gen. En sí, el objetivo de la técnica de clonación es el aislamiento, en grandes cantidades, del ADN en estudio, para ser luego usado en subsecuentes caracterizaciones o en experimentos de expresión del gen, regulación, mapeo genético u otras áreas de la genética molecular. No obstante, es importante saber con certeza, si las células contienen verdaderamente el plásmido con el ADN deseado, es por ello que se recomienda la técnica de Cracking gel, para evaluar, antes de purificar el plásmido, si el mismo contiene o no el ADN clonado. (31,32)

Southerblot es una de las técnicas más populares usadas para la identificación y detección de fragmentos de genes o de genes enteros que codifiquen proteínas de interés. La técnica es extremadamente específica y sensible. Su especificidad radica en que los fragmentos del ADN usados como sondas, se hibridizaran solamente con aquellos fragmentos de ADN que tengan idénticas secuencias complementarias a las de la sonda usada y su sensibilidad está basada en que la técnica detecta fragmentos de AND en estudio. (31,32)

La secuencia del ADN ha sido uno de los más importantes descubrimientos en la genética molecular. Esta técnica ha permitido la identificación de secuencias que determinan la iniciación, regulación y terminación de la transcripción, secuencias cromosomales inusuales y secuencias indirecta de muchas proteínas. Por lo general, en un aislamiento típico de un gen o fragmento de ADN por clonación, la secuenciación de ese ADN será uno de los fines fundamentales de la técnica de clonación. (31,32)

Silva y col. 2005, reportan que se ha trabajado arduamente en desarrollar el diagnóstico por RCP de las especies de levaduras del Género *Candida*, ellos realizaron un estudio que permitió desarrollar regiones variables particulares de cada especie y diseñar los iniciadores que están en distintas posiciones dentro del ADN ribosomal y que, en teoría, permitirían obtener fragmentos de distintos pares de base para cada una de las especies.(7) Por otra parte, Mendoza, 2005, reporta que las técnicas de biología molecular tienen la gran ventaja de ser específicas, sensibles y eficientes, permiten diferenciar especies muy relacionadas entre sí desde el punto de vista taxonómico, así como la identificación en un corto período de tiempo, de hongos que desarrollan pocas o ninguna estructura fructífera. Sin embargo, debido a exigencias de costo, infraestructura y experiencia técnica requerida, están más disponibles en laboratorios de referencia de investigación que de rutina. También considera que aún estas técnicas moleculares no deben ser abordadas en forma única, sino en conjunto con ensayos complementarios, que puedan permitir tener un conocimiento más integral con respecto a los caracteres morfológicos,

fisiológicos y genotípicos de las levaduras, hasta que estas técnicas puedan ser estandarizadas, certificadas y aplicadas en muchos laboratorios de rutina.(6)

Por lo anteriormente señalado, actualmente, se disponen junto con las pruebas rápidas convencionales, de medios de cultivos que permiten detectar especies de *Candida* provenientes de muestras de cavidad bucal. De manera general, todas estas pruebas constituyen una herramienta de ayuda en el diagnóstico micológico, que permiten no sólo diferenciar los especies de *Candida*, sino también, establecer la implementación de un tratamiento adecuado. Sin embargo, cabe señalar que es un requisito indispensable para abordar estas técnicas contar con un personal bien entrenado para la aplicación e interpretación de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liebana, J. 2002: Microbiología Oral .2da. Edición. Mac Graw Hill. Interamericana. España.
2. Arenas, R. 2008: Micología Médica Ilustrada. 3era Edición. Mac Graw Hill. Interamericana. España.
3. Pardi, G.; Cardozo, E. 2002: Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. AOV. 40(1).
4. Calderon R.; Braum, P.1991: Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 55(1): 1-20.
5. Freydiere, A.; Guinet, R. 1997: Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. Rev Iberoam Micol. 14: 85-89.
6. Mendoza, M. 2005: Importancia de la identificación de levaduras. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 25 (1).
7. Silva, V. 2005: Presente y futuro en el Diagnostico de las Micosis Invasivas. Curso de actualización en Micología Medica. Mendoza, M. 2005: Importancia de la identificación de levaduras. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 25 (1).
8. Ribero, R; Vidal, M; Vidal, I; Orgeira, J. 2003: Utilidad de las pruebas microbiológicas, histológicas e inmunológicas, en el diagnostico de la candidiasis oral. 59. 672-76.
9. Puerto, L; García-Martos, P; García-Agudo, L.; Mira, J. 2001: Candidiasis Oro faríngea. Rev. Diagn Biol. 50 (4).
10. Fisher, F.; Cook, N. 1998: Fundamental of Diagnostic Mycology, WB Saunders Company, Pennsylvania.
11. Mac-Faddin, J. 1980: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana S A. Buenos Aires, Argentina.
12. Brito, A. 2005: Detección de *Candida dubliniensis* en pacientes con candidosis del área metropolitana de Caracas. Tesis de Maestría. Universidad Experimental Francisco de Miranda. Falcón-Venezuela.
13. Salkin, I. 1998: Technology transfer and application in the clinical mycology laboratory for the 21 st century: potential for transfer and application of new technologies in routine laboratory

- operations industrialized concentrics. *Med Mycol.* 36: 276-279.
14. Goldschmidt, M.; Fung, D.; Grant, R.; White, J.; Brown, T. 1991: New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 29: 1095-1099.
 15. Lipperheide, V.; Andraka, L.; Ponton, J.; Quindos, G. 1993: Evaluation of the Albicans ID plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. *Mycoses.* 36: 417-420.
 16. Manafi, M.; Willinger, B. 1991: Rapid identification of *Candida albicans* by Fluoroplate *Candida* agar. *J Microbiol Methods.* 14: 103-107.
 17. Rousselle, P.; Freydiere, A.; Couillerot, P.; de Montclos, H.; Gille, Y. 1994: Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and Fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol.* 32: 3034-3036.
 18. Willinger, B.; Manafi, M.; Rotter, M. 1994: Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol.* 18: 47-49.
 19. De Champs, C.; Lebeau, B.; Grillot, R.; Ambroise-Thomas, R. 1995. Evaluation of Albicans ID plates. *J Clin Microbiol.* 33: 2227-2228.
 20. Odds, F.; Bernaerts, R. 1994: CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 32: 1923-9.
 21. García, M.; García, A.; Hernández, M.; Marín, P.; Tallero, E.; Mora, J. 1998: Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev. Iberoam Micol.* 15: 131-135.
 22. Quindós, G.; Alonso, V.; Heloo, S.; Arechavala, A.; Martín, M.; Negroni, R. 2001: Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (*Candida* ID ®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. *Rev. Iberoam Micol.* 18: 23-28.
 23. Baalham, T.; Caux, B.; Brown, L.; Dunsmuir, R.; Shankland, G.; Blakman, M. 2005: Evaluation of Chromogenic *Candida* Agar. 1134.
 24. Baixench, M.; Tailandier, A.; Paugam, A. 2006: Clinical and experimental evaluation of a new Chromogenic medium OCCA for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses.* 29(4): 311-315.
 25. Hoop, J.; Frey, P. 1999: Evaluation of six commercial test and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18: 188-191.
 26. Mata, E.; Carriles, C.; Gallardo, S.; Pérez, C.; Colella, L.; Magaldi, S.; Reyes, H.; Ontiveros, J.; Olaizola, C.; Suárez, R. 2002. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en Venezuela. *Antib e Infect.* 10: 165-170.
 27. Mesa, L.; Arcaya, N.; Caños, O.; Machado, Y.; Calvo, B. 2004: Evaluación de los caracteres fenotipicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam Micol.* 21: 135-138.

28. Pontón, J. 2002: Diagnóstico Microbiológico de las Micosis. Rev Iberoam Micol. 19: 25-29.
29. Sangeorzan, J.; Bradley, S.; He, X. 1994: Epidemiology of oral candidiasis in HIV-Infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. Am J Med. 97: 339-346.
30. Leinegger, C.; Lockhart, S.; Vargas, K.; Soll, D. 1996: Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. J Clin Microbiol. 34: 2246-2254.
31. Salas, E.; Arenas, R. 2001: Biología Molecular en micología Médica.39: 7-10.
32. Orbera, T. 2004: Métodos Moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol.21.15-19.