Trabajos Originales

UTILIDAD DEL AGAR CROMOCANDIDA PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE *CANDIDA* spp AISLADAS DE MUESTRAS VAGINALES*

Drs. José Luis Gatica M.^{1*}, Iván Goic B.^{1*}, María Angélica Martínez T.¹, Iván Reid S. de O.², Pablo Céspedes P.³, María Cecilia Arias E.³, Alfredo Ovalle S.⁴, Hugo Muster O.³

¹Instituto de Ciencias Biomédicas, Unidad de Microbiología y Micología. ²Centro Médico "Science". ³Departamento y Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital San Juan de Dios. ⁴Servicio y Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital San Borja Arriarán, Universidad de Chile

*Internos de Medicina

RESUMEN

Las especies de *Candida*, es la segunda mayor frecuencia de vulvovaginitis. En los últimos años *Candida* no *albicans*, aumentó su frecuencia y el diagnóstico es difícil. El empleo de Agar Cromocandida, facilite la diferenciación entre *Candida albicans* y *Candida* spp. El uso combinado de medio cromogénico y el test del tubo, permite identificar los diferentes tipos de *Candida*.

PALABRAS CLAVES: **Agar cromocandida, diagnóstico diferencial de Candidas**

SUMMARY

Candida species are the second most common cause of vulvovaginitis. In recent years an increase in the prevalence of *Candida* non-*albicans* species has been observed in some countries, making necessary their identification because of it greater resistance. The aims of our study were to evaluate the performance of the chromogenic medium Agar Cromocandida and the traditional germ test tube for the presumptive identification of strains of *Candida* spp. collected from vaginal specimens. Of 104 yeast isolates evaluated, 77 (74%) corresponded to *C. albicans*, 23 (22.1%) to *C. glabrata*, 3 (2.9%) to *C. tropicalis* and one to *C. parapsilosis*. Agar Cromocandida identified adequately 95.2% of the yeast strains. The medium performed better for the presumptive diagnosis of *C. albicans*, identifying 97.4% isolates of this species, while the usefulness of the medium for *C. glabrata* identification was only 86.9%. The germ test tube identified correctly 97/104 (93.2%) strains as *Candida albicans* and *Candida* non-*albicans*. In conclusion, Agar Cromocandida may facilitate the rapid differentiation of *C. albicans* from *Candida* spp. in vaginal specimens, whereas for the identification of *C. glabrata* an additional diagnostic procedure is required. The combined use of the chromogenic medium with the germ test tube would allow identifying most *C. albicans* strains.

KEY WORDS: **Differential diagnosis of Candida by Agar cromocandida**

*Trabajo recibido en septiembre de 2002 y aceptado para publicación por el Comité Editor en octubre de 2002.

INTRODUCCION

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es la segunda causa de infección vaginal en la mujer en edad fértil, estimándose que 75% ó más mujeres sufrirán un episodio a lo largo de la vida (1). Es causada generalmente por levaduras del género *Candida*, las cuáles forman parte de la flora comensal del intestino y vagina (1). El embarazo, la diabetes mellitus no controlada y el consumo de antibióticos son los principales factores predisponentes para al cambio de la condición patogénica de la levadura, desde CVV asintomática a CVV sintomática (1). Tradicionalmente se ha considerado que no es necesario aislar e identificar a *Candida* spp. de pacientes con CVV, ya que *C. albicans* constituiría la etiología en el 85-90% de los episodios (1). Sin embargo, en la última década la literatura extranjera ha informado un aumento progresivo en el aislamiento de especies de *Candida* no *albicans* en pacientes con CVV sintomática y asintomática, las cuales representarían más del 30% de las levaduras aisladas (2-4). Entre estas especies destacan *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, las cuáles, además, presentan menor susceptibilidad *in vitro* al fluconazol y a otros compuestos azólicos que *C. albicans*, ó exhiben resistencia intrínseca como *C. krusei* (2-7).

El diagnóstico de *Candida* spp. es más difícil que el de *C. albicans*, porque estas especies no forman tubo germinativo elemento que permite identificar rápidamente a esta última especie (8-9). Sin embargo, el aumento en la incidencia de estas levaduras hace necesario su identificación con el objeto de iniciar una terapia adecuada con relación a duración y compuesto antifúngico a elegir e impedir de esta forma su selección. Odds y Bernaerts evaluaron recientemente un medio de cultivo cromogénico, CHROMAgar *Candida*, para el aislamiento y diagnóstico diferencial presuntivo de *Candida* spp. de muestras clínicas, encontrando >99% de eficiencia para el diagnóstico de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (10).

Los objetivos de nuestro estudio fueron evaluar la eficiencia del agar cromogénico Cromocandida para la identificación de *Candida* spp. aisladas de muestras de secreción vaginal y determinar la eficiencia de la prueba de formación de tubo germinativo para la clasificación de las levaduras como *Candida albicans* y *Candida no albicans*.

MATERIAL Y METODOS

Levaduras: Se estudió un total de 104 cepas de levaduras aisladas entre abril de 1999 y octubre de

2001 de muestras de secreción vaginal. Ochenta y tres cepas fueron aisladas en el Centro Médico General Science, Sector Oriente de Santiago, doce fueron obtenidas de pacientes atendidas en el Departamento de Alto Riesgo Obstétrico del Hospital San Juan de Dios y nueve cepas fueron aisladas de pacientes atendidas en el Departamento de Alto Riesgo Obstétrico del Hospital San Borja Arriarán. Las levaduras fueron aisladas en Agar Sabouraud conteniendo 16 mg/ml de cloramfenicol y clasificadas como *C. albicans* y *Candida no albicans* de acuerdo a la formación ó no de tubo germinativo (8-9). Las cepas fueron identificadas en especie mediante microcultivo en agar maíz (8-9) y congeladas a -70°C hasta su estudio en agar Cromocandida.

Microbiología: Para la detección de la formación de tubo germinativo, se inocularon 2 – 3 colonias de un cultivo fresco en agar Sabouraud en un tubo conteniendo 0.5 ml de un pool de suero humano. Los tubos fueron incubados a 36° C por 3 h. Una alícuota de la suspensión fue posteriormente observada al microscopio de luz con objetivos de 16 y 40 X. Se consideró tubo germinativo a la formación de un túbulo delgado de paredes rectas, no septado y sin constricción en el sitio de unión con la célula madre (8-9). La identificación de las levaduras en especie fue efectuada observando su desarrollo en un microcultivo de agar harina de maíz suplementado con 1% de tween 80 (8-9). Las cepas fueron inoculadas en tres estrías paralelas sobre la superficie del agar preparado previamente en un portaobjetos. Los microcultivos fueron cubiertos con un cubreobjetos e incubados en una cámara húmeda a 25° C por 72 h. La observación del desarrollo de estructuras fúngicas de las levaduras fue efectuada observando los microcultivos al microscopio con 16 y 40X (8-9).

Para la identificación de las especies de levaduras en agar cromogénico, se inoculó una asada de un cultivo fresco en agar Sabouraud en una placa del agar Cromocandida (Valdés y Cía. Ltda, Santiago, Chile) (10). Los cultivos fueron incubados a 36° C y examinados visualmente a las 48 y 72 h para evaluar la morfología y el color de las colonias. Las cepas fueron identificadas en este medio de acuerdo a instrucciones del fabricante y a las características de las colonias publicadas por Odds y Bernaerts (10). *C. albicans* da origen en este medio a colonias verdes, *C. glabrata* genera colonias rosa rojizo púrpura, *C. tropicalis* desarrolla colonias azules, *C. krusei* forma colonias rosadas pálidas con bordes blancos y *C. parapsilosis* da origen a colonias blanco marfil.

RESULTADOS

Se estudió la eficiencia del agar Cromocandida en 104 cepas de levaduras obtenidas de muestras vaginales. Setenta y siete (74%) correspondieron a *C. albicans*, 23 (22,1%) a *C. glabrata*, 3 (2,9%) a *C. tropicalis* y una a *C. parapsilosis*.

El agar Cromocandida permitió identificar correctamente a 99 de las 104 (95,2%) cepas estudiadas. En la Tabla I se observa la eficiencia de diagnóstico de este medio según especie. El agar Cromocandida identificó correctamente todas las cepas de *C. tropicalis*, la cepa de *C. parapsilosis* y 97,4% y 86,9% de las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* respectivamente. Dos cepas de *C. albicans* fueron identificadas en este medio como *C. tropicalis*, mientras que el color de las colonias de 3 cepas de *C. glabrata* fue ambiguo y muy similar al descrito para *C. krusei*.

La prueba de formación de tubo germinativo clasificó correctamente como *C. albicans* y *Candida* no *albicans* a 97/104 (93,3%) cepas estudiadas. Se observaron 4 (3,8%) falsos tubos germinativos, mientras que en 3 cepas de *C. albicans* (2,9%) no se observó formación de tubo germinativo.

DISCUSION

Los resultados de este estudio son similares a los comunicados en la literatura extranjera y que señalan un aumento en la incidencia de especies de *Candida* no *albicans* en CVV y la emergencia de *C. glabrata*. El 74% de las cepas incluidas en nuestro estudio correspondieron a *C. albicans* y el 26% a especies de *Candida* no *albicans*, siendo *C. glabrata* la especie de *Candida* no *albicans* más frecuentemente aislada, 22,1% (2-4). Este cambio epidemiológico tiene repercusiones clínicas, ya que estas especies son menos susceptibles a los compuestos azólicos que la *C. albicans* (2-7). Sobel y Chain han sugerido que el gran uso de terapias antifúngicas con compuestos azólicos, el mayor uso de terapias de corta duración con antifúngicos orales ó de uso tópico y la autoprescripción de antimicóticos de uso tópico serían los factores responsables del aumento de la incidencia de *C. glabrata* en CVV, ya que actuarían por un mecanismo de selección (6). *C. glabrata* ha sido también asociada con CVV crónica y recurrente en estudios que incluyeron un número importante de pacientes con CVV crónica por esta especie (3-6, 11). La mayoría de las pacientes había recibido en el último año múltiples tratamientos con antifúngicos azólicos, lográndose solo la mejoría clínica y erradica-

TABLA I
EFICIENCIA DEL AGAR CROMOCANDIDA PARA LA IDENTIFICACION DE *CANDIDA* spp DE MUESTRAS VAGINALES

Especies Nº(%) cepas	Nº(%) cepas correctamente identificadas	
<i>C. albicans</i>	77 (74)	75 (97,4)
<i>C. glabrata</i>	23 (22,1)	20 (86,9)
<i>C. tropicalis</i>	3 (3,9)	3 (100)
<i>C. parapsilosis</i>	1	1

ción microbiológica con supositorios vaginales de ácido bórico por 14 días (2-3).

Con el objeto de optimizar el manejo y tratamiento de la CVV, se ha revisado las características clínicas de pacientes con CVV por *C. glabrata*, observándose similitud con los hallazgos clínicos presentes en pacientes con CVV por *C. albicans* (2,4, 11). No obstante, Fidel y cols. observaron que pacientes con CVV por *C. glabrata* presentaban con menor frecuencia inflamación vulvovaginal y dispareunia y el flujo vaginal no tenía la consistencia caseosa que se observa en la CVV por *C. albicans* (11). *C. glabrata* se distingue de otras especies de *Candida* por no formar filamentos ó hifas para adherirse a la pared vaginal (9), lo que podría explicar según los autores, las diferencias observadas entre pacientes con *C. albicans* ó *Candida* spp. (11).

El diagnóstico presuntivo de *C. albicans* se efectúa por la observación de un tubo delgado, llamado tubo germinativo, que se forma cuando se incuba la levadura en suero humano a 35-36° C por 2-3 h, sin embargo, se ha descrito que algunas especies de *Candida*, como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* producen estructuras similares a tubos germinativos (12). Por otra parte, se ha observado que alrededor del 5% de las cepas de *C. albicans* no forman tubo germinativo (13). En nuestra experiencia, la prueba del tubo germinativo identificó correctamente como *C. albicans* y *Candida* no *albicans* al 93% de las levaduras estudiadas.

El agar Sabouraud es el medio de cultivo selectivo más empleado para el aislamiento de levaduras de muestras clínicas. Las características de las colonias en este medio son similares, siendo por ello imposible distinguir con seguridad entre las especies de levaduras. Los agares cromogénicos son medios de cultivo de reciente formulación, con un gran empleo en los laboratorios clínicos para el estudio bacteriológico de urocultivos. Recientemente se han desarrollado medios para el aislamiento e identificación presuntiva de levaduras. Los medios

contienen sustratos cromogénicos que permiten, al crecer los microorganismos, dar origen a colonias de distintos colores y en algunos casos con morfologías diferentes. En nuestro estudio, el agar Cromocandida identificó correctamente al 97,4% de las cepas de *C. albicans* y al 100% del pequeño número de cepas de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. El rendimiento del agar para la identificación de *C. glabrata* fue de solo 86,9%. Odds y Bernaerts, como asimismo los fabricantes del medio han descrito el color de las colonias de *C. glabrata* en agar cromogénico como rosa, rojizas ó púrpura (10). Sin embargo, otras nueve especies de *Candida*, entre las que destaca por su frecuencia de aislamiento, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*, dan origen a colonias descritas de igual color, causando ambigüedad y confusión en la identificación (10). Odds y Bernaerts estudiaron las características de crecimiento de 726 cepas de levaduras aisladas de cultivos stock del laboratorio y de muestras clínicas en CHROMagar *Candida*, pudiendo identificar correctamente a > 99% de las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* evaluadas (10). Los investigadores incluyeron 84 cepas de *C. glabrata*, pero no indicaron la utilidad del medio para la identificación de esta especie. A su vez, Pfaller y cols. emplearon el CHROMagar *Candida* para la identificación rápida de *Candida* spp. a partir de 547 muestras de deposición ó torulados rectales de pacientes atendidos en una Unidad de Cuidados Intensivos en EUA (14). De las 316 cepas de levaduras aisladas, el agar identificó correctamente al nivel de especie a > 95% de las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* y el 94% de las cepas de *C. glabrata*. Los autores observaron algunas dificultades para la identificación de otras especies de *Candida*.

C. dubliniensis es una especie de *Candida* recientemente descrita. Ha sido aislada principalmente de candidiasis oral en pacientes con SIDA, aunque más recientemente ha sido aislada de infecciones invasivas en pacientes con otros inmunocompromisos (15). Al igual que *C. albicans* forma tubos germinativos y en microcultivos genera clamidosporas, elemento base en la identificación de *C. albicans*. En agar cromogénico da origen a colonias descritas de color verde oscuro, mientras que las colonias de *C. albicans* han sido descritas como verdes (10). Sin embargo, en nuestra experiencia *C. albicans* forma colonias verdes de distinta intensidad, dependiendo de la densidad de crecimiento y tiempo de incubación. La separación definitiva de ambas especies solo puede efectuarse por el estudio de la actividad enzimática β -galactosidasa, ó

por su patrón de DNA (16). Por este motivo, es posible que alguna de las cepas identificadas en nuestro estudio como *C. albicans* correspondan realmente a *C. dubliniensis*. Será importante considerar la limitación del agar cromogénico para la diferenciación de ambas especies si la incidencia de *C. dubliniensis* comienza a ser significativa.

En resumen, los resultados de nuestro estudio permiten sugerir la necesidad de efectuar la identificación de las especies de *Candida* de muestras vaginales, ya que un tercio de ellas corresponderían a *Candida* spp., las cuales han sido asociadas con una menor susceptibilidad a los antifúngicos. El agar Cromocandida sería eficiente para la identificación presuntiva de *C. albicans*, pero tendría utilidad limitada para el diagnóstico de *C. glabrata*, segunda especie de levadura aislada en nuestro estudio de muestras vaginales. El uso combinado de la prueba de tubo germinativo y agar Cromocandida permitiría identificar correctamente a la mayoría de las cepas de *C. albicans*. Para el diagnóstico de *C. glabrata*, sería necesario utilizar adicionalmente algún otro sistema de identificación para confirmar la sospecha en agar Cromocandida, ya que el crecimiento de esta especie en este medio es similar al de varias especies de *Candida* spp.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos al Dr. Víctor Silva Vargas, académico del Programa de Microbiología y Micología, de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, su gentil y desinteresada colaboración para la implementación de la técnica de Microcultivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Sobel JD: Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol 1993; 36: 152-65.
2. Redondo-López V, Lynch M, Schmitt C, Cook R, Sobel JD: Torulopsis glabrata vaginitis: Clinical aspects and susceptibility to antifungal agents. Obstet Gynecol 1990; 76: 651-5.
3. Spinillo A, Capuzzo E, Egbe TO, Baltaro F, Nicola S, Piazzi G. Torulopsis glabrata vaginitis. Obstet Gynecol 1995; 85: 993-8.
4. Fidel PL, Vásquez JA, Sobel JD: *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 80-96.
5. Horowitz BJ: Antifungal therapy in the management of chronic candidiasis. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 996-7.
6. Sobel JD, Chaim W: Treatment of Torulopsis glabrata vaginitis: Retrospective review of boric acid therapy. Clin Infect Dis 1997; 24: 649-52.

7. Sobel JD, Faro S, Force R, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR: Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 203-11.
  8. Campbell MC, Stewart JL: The medical mycology handbook. New York: John Wiley & Sons, 1980.
  9. Forbes BA, Sahm DF y Weissfeld AS: Laboratory methods in basic mycology. Bailey & Scott's. *Diagnostic Microbiology*. 10th ed. New York: Mosby Inc, 1998.
  10. Odds FC, Bernaerts R: CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-9.
  11. Nyirjesy P, Seeney SM, Terry Grody MH, Jordan CA, Buckley HR: Chronic fungal vaginitis: The values of cultures. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 820-3.
  12. Huppert MG, Harper G, Sun SH, Delanerolle V: Rapid methods for identification of yeasts. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 21-34.
  13. Salkin IF, Land GA, Hurd NJ, Goldson PR, McGinnis MR: Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 624-7.
  14. 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; 34: 58-61.
  15. Meis JFGM, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W, Verwey PE: *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 1-7 (disponible en Internet).
  16. Pinjon E, Sullivan D, Salkin L, Shanley D, Coleman D: Simple, inexpensive, reliable methods for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1988; 36: 2093-5.
-