

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CÁNDIDAS CON UN MÉTODO COLORIMÉTRICO APLICADO AL DIAGNÓSTICO EN PODOLOGÍA

Raquel Mayordomo Acevedo, José Román Muñoz del Rey, Ana M^a Pérez Pico, M^a José Iglesias Sánchez¹.

1. Profesores del Título de Grado de Podología, Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura.

CORRESPONDENCIA

Dra. Raquel Mayordomo Acevedo
Profesora del Título de grado en Podología
Centro Universitario de Plasencia
Avda. Virgen del Puerto, 2,
10600 Plasencia, Cáceres.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CÁNDIDAS
CON UN MÉTODO COLORIMÉTRICO
APLICADO AL DIAGNÓSTICO EN PODOLOGÍA

RESUMEN

Las onicomycosis son enfermedades causadas por hongos dermatofitos y también por distintas especies de cándidas que afectan a las uñas de los pies. Un nuevo método que utiliza un medio diferencial selectivo, *Brilliance™ Candida Agar* (anteriormente *Oxoid Chromogenic Candida Agar* (OCCA)) facilita el rápido aislamiento e identificación de distintas especies de cándida de interés clínico. Este método está basado en los distintos colores que, según la especie, produce la colonia crecida en placa por metabolismo de los componentes de dicho medio. Es un medio útil por la aparición cada vez más frecuente de especies de levaduras distintas a *C. albicans* que permite una identificación rápida, sencilla y aplicable a la Clínica de Podología. La importancia de conocer la especie infectante radica en la posibilidad de ajustar o modificar el tratamiento si identificamos alguna levadura con resistencia natural a fármacos azólicos (ketoconazol), como es el caso de *C. krusei* y así poder utilizar un antimicótico alternativo.

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de este método en las muestras recibidas en el Servicio de Diagnóstico Molecular de la Clínica Podológica de la UEx durante el año 2009, mostrando la incidencia de las distintas especies. Los resultados muestran una mayor presencia de *C. parapsilosis* (42%) y *C. glabrata* (40%) frente a *C. tropicales* (4%), *C. krusei* (4%) y *C. albicans* (4%) que no se aíslan con tanta frecuencia.

PALABRAS CLAVE

Onicomycosis, Especies Candida, Método Colorimétrico, Cultivos en Placa.

ABSTRACT

Onicomycosis are pathologies caused by dermatophytes and by different species of *Candida*. They affect the nail of the foot. A method including a selective differential medium, *Brilliance™ Candida Agar* (formerly *Oxoid Chromogenic Candida Agar*, OCCA), facilitates fast isolation and identification of different species of clinic interest. This method is based in different colours produced by the metabolism of specific species of *Candida*. Nowadays, this is very useful method due to the more frequent apparition of candidas which are different to *C. albicans*. This kind of medium allows us rapid, simple and applicable identification to Podologist in their Clinics. It is important to know the infecting specie in order to adjust the treatment depending on the isolated specie. As there are some species with natural resistance to ketoconazol, like *C. krusei*, when we isolate it, we have to offer an alternative antimicotic treatment.

In the present work we show the results obtained in the application of this method to samples received at the Molecular Diagnostic Unit of the Clinic of Podology at Extremadura University during 2009. We show the incidence and distribution of the different species with a high presence of *C. parapsilosis* (42%) and *C. glabrata* (40%) in comparison with *C. tropicales* (4%), *C. krusei* (4%) and *C. albicans* (4%), which are not isolated with high frequency.

KEY WORDS

Onicomycosis, *Candida* sp., Colorimetric method, Petri Dish Culture.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas, en especial las causadas por levaduras, han incrementado su incidencia en los últimos años debido al aumento de pacientes inmunocomprometidos^{3,4}, donde se comportan como oportunistas, y al mayor número de cepas de levaduras resistentes a los antifúngicos^{1, 15, 13}.

Las levaduras son microorganismos comensales que pueden llegar a ser patógenos y producir infecciones oportunistas que afectan a pacientes diversos como inmunodeprimidos, diabéticos, pacientes con alteraciones dérmicas⁸. En el caso de las onicomicosis, las levaduras, junto a los hongos dermatofitos, suelen presentar un papel etiológico destacado^{10, 6}. Por ello, la utilización de un método que facilite el rápido aislamiento e identificación de las distintas especies de levaduras, representadas en su mayoría por el género *Candida*, puede contribuir a un mejor manejo clínico, así como al ajuste del tratamiento en función de la especie de levadura aislada.

En este sentido se han presentado por diversas casas comerciales, medios de cultivo colorimétricos, que incluyen componentes que, de forma específica, reaccionan con las distintas colonias dando lugar a una coloración típica de cada especie^{9, 12, 2, 5}. Con el objeto de evaluar esta tecnología, nuestro grupo ha aplicado el medio cromogénico O.C.C.A. (Oxoid) para el diagnóstico en pacientes que acuden a la Clínica Podológica Universitaria de la UEx con sospecha de micosis, y de este modo, identificar y conocer la distribución de las levaduras aisladas en nuestra población.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha desarrollado en la Clínica Podológica Universitaria de la UEx, con las muestras recibidas en el Servicio de Diagnóstico adscrito a dicha clínica. Se han tomado muestras consecutivas de raspado y/o trozos de uña en 100 pacientes con sospecha de infección fúngica úngela (Figura, 1) y se ha procedido al cultivo para determinar la presencia de dermatofitos, así como levaduriformes. El medio inicial fue Agar Sabouraud con cloranfenicol, y Agar Sabouraud con Cloranfenicol y ciclohexidina que es selectivo para aislar dermatofitos y levaduras y posteriormente los cultivos que mostraron crecimiento de levaduriformes (Figura, 2) se subcultivaron en un nuevo método que utiliza un medio diferencial selectivo, Brilliance™ *Candida* Agar (antiguo Oxoid Chromogenic *Candida* Agar (OCCA), bien en cultivo directo o por subcultivo de colonias levaduriformes. Este es un medio que emplea dos cromógenos para la diferenciación de las colonias de *C. albicans* (verdes) de las de *C. tropicalis* (azul oscuro) (Figura, 3), *C. krusei* (rosado marrón) (Figura, 4), de *C. parasilopsis* (café, marrón) (Figura, 5), *C. glabrata* (colonias beige, amarillo), en una sola incubación.



Figura 1. Uña con sospecha de onicomicosis.

El estudio se ha desarrollado en la Clínica Podológica Universitaria de la UEx, con las muestras recibidas en el Servicio de Diagnóstico adscrito a dicha clínica. Se han tomado muestras consecutivas de raspado y/o trozos de uña en 100 pacientes con sospecha de infección fúngica úngela (Figura, 1) y se ha procedido al cultivo para determinar la presencia de dermatofitos, así como levaduriformes. El medio inicial fue Agar Sabouraud con cloranfenicol, y Agar Sabouraud con Cloranfenicol y ciclohexidina que es selectivo para aislar dermatofitos y levaduras y posteriormente los cultivos que mostraron crecimiento de levaduriformes (Figura, 2) se subcultivaron en un nuevo método que utiliza un medio diferencial selectivo, Brilliance™ *Candida* Agar (antiguo Oxoid Chromogenic *Candida* Agar (OCCA), bien en cultivo directo o por subcultivo de colonias levaduriformes. Este es un medio que emplea dos cromógenos para la diferenciación de las colonias de *C. albicans* (verdes) de las de *C. tropicalis* (azul oscuro) (Figura, 3), *C. krusei* (rosado marrón) (Figura, 4), de *C. parasilopsis* (café, marrón) (Figura, 5), *C. glabrata* (colonias beige, amarillo), en una sola incubación.



Figura 2. Placa de AGAR Saburoa+cloranfenicol, con colonias crecidas de *Candida* sp.



Figura 3. Colonias de *C. tropicalis* crecidas en medio cromogénico mostrando un característico color azulado.



Figura 4. Colonias de *C. krusei* crecidas en medio cromogénico que muestran un tono marrón rosado.



Figura 5. Colonias de *C. parasilopsis* crecidas en medio cromogénico que muestran un tono marrón oscuro.

Nos permite identificar 5 tipos de especies y en caso de duda o falta de identificación contamos con la colaboración del Hospital Virgen del Puerto que cuenta con tarjetas de identificación de levaduras Vitek-YST (BioMerieux®) para identificación definitiva. Hemos sembrado 100 muestras de pacientes con sospecha de infección fúngica, que fueron subcultivadas en medio Brillance. Sólo 30 muestras permitieron aislar colonias de levaduras, el resto de las muestras fue positivo para dermatofito o, bien, negativo.

RESULTADOS

De las 100 muestras, se obtuvieron 30 muestras positivas para *Candida* sp, contando con 35 cepas aisladas, que corresponden a *C. albicans*; (4%), *C. tropicalis* (4%) (Figura, 3), *C. krusei* (4%) (Figura, 4), *C. glabrata*; (40%) y *C. parasilopsis*, (42%) (Figura, 5), y el resto de las especies como *Candida* sp (6%). Los porcentajes están recogidos en la gráfica de la Figura 6.



Figura 6. Gráfica que representa los porcentajes obtenidos de las diferentes colonias aisladas en las muestras procesadas.

A la vista de los resultados podemos afirmar que la especie que se aísla con mayor frecuencia en las muestras procedentes de la atención podológica, todas ellas provenientes de raspado y/o corte de uñas del pie, es *C. parasilopsis* seguida muy de cerca por *C. glabrata* que destacan con gran diferencia en el número de aislamientos frente al resto de especies.

Así mismo, cabe destacar de los resultados obtenidos, la importancia de distinguir el aislamiento de *C. krusei* (Figura 4) que, aunque no muy frecuente (4%), hay que tenerlo en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento eficaz y poder obtener la cura de la uña afectada.

DICUSION

La aplicación al laboratorio de Microbiología, o bien a la Consulta de Podología de medios de cultivo diferenciales, como el propuesto en este estudio, nos permite una serie de ventajas como son la rapidez en el crecimiento y obtención de resultados de identificación presuntiva en 48 horas, sin requerir mucha experiencia ni recursos técnicos^{9, 12, 2, 5}.

Los medios de cultivos diferenciales son métodos basados en la detección de actividad enzimática. Contienen una serie de medios que se han enriquecido con sustratos cromogénicos o fluorogénicos y que permiten poner de manifiesto la presencia de un grupo de enzimas del hongo. Los que utilizan sustratos fluorogénicos detectan beta-galactosaminidasa y requieren de una lámpara de Wood para su lectura. En cuanto a los que utilizan sustratos cromogénicos detectan betagalactosaminidasa y L-prolinaminopeptidasa. Existen en el mercado una gran variedad de medios diferenciales que pueden diferir en cuanto a su sensibilidad, especificidad y precio. Entre estos tenemos: El medio Chromagar Candida descrito por Odds. y Barnaerts en 1994⁹, uno de los primeros en salir al mercado, y hoy contamos con Fluoroplate Candida®, Agar SDCA-MUAG®, CHROMagar Candida®, Agar Candida Cromogénico®, Candida ID®, Albicans ID®, Chromalbicans Agar®.

Nuestro grupo ha incorporado Agar Candida Cromogénico Oxoid® (OCCA®), que nos ha permitido caracterizar que subespecie tiene mayor incidencia en las muestras de uñas y partes blandas recogidas del pie dentro del Servicio de Diagnostico Molecular de la Clínica Podológica de la UEx.

La identificación se realiza a partir de la siembra de la muestra en cultivo primario y nos permite diferenciar por el color que presenta en el propio medio. Otro hecho relevante es la posibilidad de diagnosticar infecciones mixtas, al distinguir a simple vista las distintas levaduras que coexistan en una misma muestra, tal y como nos sucedió en 4 cultivos de nuestra serie. Sin embargo, también es cierto que sólo pueden identificar unas pocas especies y son menos específicos que otras pruebas de identificación como pueden ser las pruebas de asimilación de compuestos de carbono, usadas clásicamente como gold-standard. Pero en nuestra serie más del 95 % de las levaduras aisladas fueron identificadas con este medio cromogénico, y sólo un 5% fueron enviadas para confirmación al laboratorio de Microbiología de referencia.

Las levaduras no pertenecientes a la especie *albicans* eran raras hace unos años, y casi nunca superaban la mitad de los aislados, como podemos comprobar en la bibliografía que tradicionalmente mostraba la tendencia predominante de *C. albicans*¹³. En un estudio previo realizado en el hospital Virgen del Puerto de Plasencia⁷, la serie incluía una diversidad de muestras clínicas y *C. albicans* fue la levadura más aislada representando el 70 %, seguida de *C. glabrata* (9%) y *C. parapsilosis* (7%). A pesar de ello hay series como la de Sanabria et al. (2006), que en muestras procedentes de orinas predominaban las especies distintas de *C. albicans*.

Los resultados obtenidos indican que la principal especie responsable de infecciones en el pie es *C. parapsilosis*. A diferencia de anteriores estudios donde se observaba que la especie con mayor incidencia en muestras de exudados vaginales que fue *C. albicans*.

Otro aspecto muy importante, y que presenta una ventaja frente a otros medios cromogénicos en la identificación es la posibilidad de distinguir dos especies de levaduras como *C. glabrata* y *C. krusei*, con importantes implicaciones en las pautas de tratamiento. Estas especies van desplazando a *C. albicans*. En concreto, el aumento de *C. glabrata* se explica por el uso profiláctico de fluconazol a bajas dosis (<400mg/día) lo que selecciona a dicha especie^{14, 11}. Cabe destacar que *C. krusei* presenta resistencia natural al fluconazol y su identificación es fundamental para la elección del antifúngico adecuado en aras de un uso racional del medicamento¹⁵.

Aunque nosotros usamos el medio cromógeno tras crecimiento en Agar Sabouraud enriquecido con antibióticos, el procedimiento permite usarlo como placa primaria de cultivo, mediante siembra directa de la muestra clínica para casos urgentes como evolución tórpida, pacientes con tratamientos azólicos previos o pacientes graves, diabéticos o donde el podólogo crea que es fundamental un diagnóstico rápido, al obtener resultados antes de las 48 horas seguidas a la obtención de la muestra.

Por todo ello, creemos que los medios cromogénicos, en general, pueden incorporarse a la práctica podológica de forma rutinaria al tratarse de una técnica sensible, específica, muy rápida, que requiere de unos conocimientos básicos y que va a permitir una atención y cuidado más próximo al enfermo con implicaciones en el tratamiento, lo que redundará en beneficio de la comunidad al contribuir al uso racional de medicamento, evitando aparición de resistencia y efectos secundarios innecesarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ibrahim E.H. et al., The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*, 2001; Vol. 118(1):146-55
2. Cooke VM, Miles R, Price R, Midgley G, Khamri W, Richardson C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, Vol. 68(7):3622-7.
3. Crowe S, Carlin JB, Steward KJ, Lucas CR, Hoy JF. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; Vol. 4:770-6.
4. De Laet Sant'Ana P, Pipalo Milan E, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcantara AP, et al. Multicenter brazilian study of oral candida species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2002; Vol. 97(2):253-7.
5. Trujillo, V., Guilarte, C. Pardi, G., Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*. 2006; Vol. 47 (3). Artículo electrónico
6. Mayordomo Acevedo R., Hidalgo Ruiz S., Pérez Pico A.M. Estudio de la eficacia de la sospecha clínica en la detección de onicomicosis. *Rev. Esp. Podología*. 2007; Vol. 18 (3): 114-120
7. Muñoz J.R., Asensio M., Márquez I., Jiménez M., Mengotti T., Fuentes E. Identificación de Especies de *Candida* en el Bienio 2006-2007., II Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, Junio 2008 La Coruña
8. Muriel M, Vizzaino MJ, Bilbao R, Herruzo R. Identificación de levaduras y sensibilidad in vitro a diversos antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 2000; Vol.18:120-4.
9. Odds FC, Barnaerts R., CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important candida species. *J Clin Microbiol*; 1994; Vol. 32:1923-9.
10. Odds, F. C., *Candida and candidosis*, 2nd ed. Baillière Tindall, 1988. London, England.
11. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to candida species: Frequency of occurrence and In vitro susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol*; 2001; Vol. 39: 3254-9.
12. Ruiz-Aragón J., García-Martos P, Puerto J. L., Marín P., Saldarrea A., Moya P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagn Biol*. 2003; Vol.52 (1):19-22.
13. Sanabria R, Samudio MI, Fariña N I,II, Laspina FI,V, Ortelado de Canese JIII. Arbizu Ledesma GIV, Laconich Romero MIII,V, Rodríguez H. Identificación de especies de candida aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados, e inmunocomprometidos en Paraguay. IV.V. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 2006; Vol. 4(2):45-49.
14. Sheehan, D. J. et al. Current and Emerging Azole Antifungal Agents *Clinical Microbiology Reviews*, 1999; Vol.12(1): 40-79
15. Wang JL, Chang SC, Hsueh PR, Chen YC., Species distribution and fluconazole susceptibility of candida clinical isolates in a medical center in. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004; Vol. 37:236-41.