

REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN LAS CANDIDIASIS

Y. CAPINTEIRO FEIJÓO¹, M.C. RODRÍGUEZ CERDEIRA²

INTRODUCCIÓN

Candida spp. constituye la primera causa de infección fúngica en pacientes inmunodeprimidos, siendo la especie patógena predominante *C. albicans* tanto en infecciones superficiales como sistémicas.

La identificación de *C. albicans* se ha realizado en los laboratorios en base a la morfología y a las características metabólicas. Estos métodos son lentos y laboriosos por lo que la demostración del agente causal se realiza en estados avanzados de la enfermedad.

Por otro lado, la identificación en determinados casos es difícil, lo que retrasa la instauración de un tratamiento antifúngico adecuado en estos pacientes.

La introducción de nuevas tecnologías diagnósticas basadas en métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección e identificación de *Candida spp.* va a suponer mejoras en los diagnósticos y tratamientos de enfermedades.

DIAGNÓSTICO DE LAS CANDIDIASIS CUTANEOMUCOSAS.

En todo caso clínico sospechoso de candidiasis, la única forma de establecer un diagnóstico seguro consiste en evidenciar la levadura mediante el examen micológico directo y cultivos^{1,2}. Es posible también realizar tinciones que nos orientan en el diagnóstico.

1. En primer lugar se realiza la toma de muestra del paciente, usando un hisopo o torunda estéril, frotando con él la superficie de la lesión y haciendo inmediatamente la visión directa y la siembra. En las muestras de orofaringe, la toma se puede realizar con un hisopo o también mediante lavados de boca. En la estomatitis angular se hace raspado con bisturí recogiendo las escamas.

En las vaginitis se hace la toma con torundas estériles de los fondos de saco vaginales. En las balanitis se toman

las lesiones blanquecinas con espátula estéril sembrando directamente en el medio de cultivo y haciendo improntas en portas para efectuar el examen directo.

En las uñas se hace una incisión con lanceta y se recoge con asa estéril la serosidad hemática.

En lesiones cutáneas (ingles, surcos inflamatorios, pliegues interdigitales) se obtienen escamas por raspado con bisturí. Las escamas se recogen en una placa Petri estéril.

Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, se deben usar hisopos que llevan medio gelatinoso o líquido.

Del material obtenido, una parte se destina al examen directo y otra al cultivo.

2. Examen directo: Se visualizan blastosporas (blastoconidios) es decir, células levaduriformes gemantes, o bien blastosporas y pseudomicelios.

Para ello se coloca la muestra entre porta y cubre objetos, se añade KOH al 10-40% y se calienta ligeramente en la llama del mechero. En las vaginitis se utiliza para el examen directo una muestra de flujo vaginal recogida de fondo de saco y obtenida bien por torunda o espátula. La muestra se observa directamente o bien se monta con una gota de suero fisiológico o agua estéril. La visión del flujo vaginal en fresco sin calentar con el mechero, para evidenciar *Trichomonas vaginalis* es diagnóstica y no requiere la realización de cultivos.

3. Cultivo: Para realizar la siembra, se introduce el hisopo en el medio si éste es líquido y se frota con él la superficie si es sólido. El crecimiento de levaduras en estas muestras, debe interpretarse con precaución ya que *C. albicans* es un componente habitual de la flora de las mucosas gastrointestinal, vaginal y oral de los seres humanos y de un 10% a un 50% de los individuos sanos presentan *Candida spp.* en estas localizaciones. Como medio de rutina se usa el agar Sabouraud, agregándole un antibiótico antibacteriano (cloranfenicol, gentamicina, estreptomycin) para evitar el crecimiento de las bacterias. Las colonias de *Candida spp.* se desarrollan en 48-72 horas, son de color blanquecino, redondeadas de apenas 1 cm de diámetro.

En el medio de Nickerson, la *C. albicans* y alguna otra especie forman colonias de color marrón oscuro o negro.

1 - Especialista en Microbiología

2 - Servicio de Dermatología. Hospital do Meixoeiro. Vigo.

Candida spp. constituye la primera causa de infección fúngica en pacientes inmunodeprimidos.

El medio de Pagano es idéntico al de Sabouraud con adición de un indicador (trifenil-tetrazolio-clorhídrico); *C. albicans* no reduce el color del tetrazolio siendo sus colonias blancas, mientras que las de otras especies presentan un color que va desde el rosa al rojo. Otros medios de cultivo como agar sangre o agar chocolate destinados fundamentalmente al crecimiento de bacterias, pueden ser válidos para el aislamiento de *Candida spp.* Dos medios cromogénicos como el CHROMagar *Candida* y el Albicans ID permiten diferenciar *C. albicans* de otras especies por la morfología y el color de la colonia³.

4. Tinciones: La más empleada es la de Gram. Las especies del género *Candida* aparecen como células Gram positivas, levaduriformes, de pared delgada, pequeñas, ovales y ocasionalmente en gemación. Algunas veces se encuentran elementos miceliales y células con yemas adheridas a las hifas a nivel de los puntos de constricción.

5. Identificación de levaduras:

- Producción de tubos germinativos al incubar la levadura en suero, medios celulares u otras sustancias coloidales durante 2-4 horas a 37°C.
- Producción de clamidosporas (clamidoconidios) que son esporas terminales o laterales, en medios agar-harina de maíz+Tween 80, agar patata-zanahoria-bilis, o agar-crema de arroz, estas estructuras se observan a las 48 horas.
- Pruebas bioquímicas como son el auxonograma que valora la asimilación de carbohidratos en un medio base sin azúcares y el zimograma que estudia la vía fermentativa de las levaduras sobre los carbohidratos.
- Sistemas comerciales: Sistema API con el que se pueden realizar auxonograma y zimograma.
- Otros sistemas de identificación: "Microring" basado en la inhibición del crecimiento de la levadura por diferentes colorantes o sustancias antifúngicas y Sistemas rápidos de identificación que se basan en la existencia de enzimas preformadas que reaccionan con los sustratos adecuados. Sistema "Fongiscreen" basado en el uso de sustratos deshidratados de enzimas fúngicas, de forma que se produce un cambio de color por adición de un reactivo revelador en 4 horas. El sistema "Auxacolor" se basa en el principio de asimilación de azúcares y se observa crecimiento a las 24-72 horas.
- También existe un sistema de identificación inmunológica llamado "Cand-Check" basado en la aglutinación de una suspensión de levaduras por antisueros específicos.

DIAGNÓSTICO DE LAS CANDIDIASIS SISTÉMICAS.

El diagnóstico de candidiasis diseminada continúa siendo un escollo para el clínico. Por una parte, la interpretación de hemocultivos positivos a *Candida* es difícil ya que puede deberse a una contaminación cutánea o de un catéter intravenoso o por el contrario tratarse de

una verdadera sepsis por *Candida*. Por otra parte las técnicas serológicas como veremos después son poco sensibles.

Por ello, el diagnóstico de candidiasis diseminada es clínico. Se deben tener en cuenta la enfermedad

de base, los posibles factores predisponentes a candidiasis y la presencia de catéteres intravenosos. La demostración de una invasión candidiásica visceral constituye la confirmación diagnóstica definitiva.

1. Toma de muestra y examen directo: Las muestras se deben recoger asépticamente y enviar rápidamente al laboratorio. Si no se procesan inmediatamente se guardan a 4°C. Al igual que se ha descrito en las candidiasis superficiales, el examen microscópico directo con KOH al 10-40% permite la observación de levaduras en tejidos y biopsias, secreciones respiratorias (lavado broncoalveolar, aspiración transtraqueal, esputo), líquidos biológicos o material purulento. Este es un método rápido y sensible, aunque la tinción con azul de metileno y sobre todo el Gram, además de visualizar las levaduras, permite observar si hay otros microorganismos asociados. La presencia de pseudofilamentos confirma la identificación inicial de *Candida spp.*

2. El cultivo es imprescindible para identificar la especie causal y poder efectuar estudios de sensibilidad "in vitro" a los antifúngicos. Se pueden emplear medios micológicos como agar Sabouraud y bacteriológicos. En el caso de hemocultivos, se desarrollan bien en medios difásicos como Ruiz-Castañeda.

3. Identificación: Se realiza de la misma forma que en las candidiasis superficiales.

En las candidiasis sistémicas además de las técnicas usadas en el diagnóstico micológico, se emplean métodos de diagnóstico inmunológico que se basan en la detección de antígenos o productos metabólicos de *C. albicans* y en la detección de anticuerpos contra los antígenos^{4,5,6}.

La detección de antígenos de *Candida* en suero, orina, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos ha sido descrita por distintos investigadores. Los antígenos cuya detección se ha intentado principalmente en suero son: antígenos mananos de la pared celular, antígenos proteicos citoplasmáticos y productos metabólicos como la manosa y el arabitól. Para la detección de la antigenemia se usa la prueba de aglutinación del látex, mientras que para los metabolitos se usan técnicas de cromatografía gas-líquido. Diversos autores han comparado las sensibilidades y especificidades de distintas pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la candidemia. Así, Mitsutake y Cols.⁵ detectan el antígeno enolasa, el antígeno manano, el antígeno lábil al calor y el beta-glucano en muestras de suero de 39 pacientes con candidemia entre 1990 y 1993. La detección del antígeno enolasa presenta la mayor especificidad (100%), pero la sensibilidad es del 72%; de la misma forma la técnica de detección del antígeno manano tiene una sensibilidad del 100% pero su especificidad es mucho menor (26%).

*El diagnóstico de
candidiasis disminada
continúa siendo
un escollo para
el clínico.*

Los resultados obtenidos por estos autores demuestran que las técnicas de detección de antígeno son útiles en el diagnóstico de la candidemia, y aunque ninguna aisladamente es satisfactoria, la combinación de dos de ellas presenta mayores ventajas.

Matthews y Cols.⁴ han hecho una revisión comparativa de los métodos usados en la detección de antígenos candidiásicos obteniendo resultados similares a los anteriores para el antígeno manano y el antígeno enolasa. Otros como son la proteinasa de *Candida* presenta una especificidad difícil de determinar y la medida de metabolitos como el arabitol tiene una baja sensibilidad. Concluyen por tanto que en el laboratorio se deberían usar dos métodos distintos al menos una vez a la semana en pacientes de alto riesgo.

En la detección de anticuerpos se han usado diversas técnicas y los resultados obtenidos son motivo de controversia debido a la diferente composición y calidad de los antígenos, al hecho de que personas sanas pueden presentar anticuerpos frente a *Candida* (aunque por lo general con títulos bajos) y también porque los pacientes inmunodeprimidos pueden no ser buenos productores de anticuerpos.

Además de pruebas como contrainmuno-electroforesis, hemaglutinación, etc., actualmente se recomienda el uso de técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) que aportarían mejores resultados.

NUEVAS TECNOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS.

Sus objetivos consisten en disponer de un método rápido de detección e identificación de hongos con importancia clínica^{7,8}.

Diferentes autores han desarrollado distintos abordajes experimentales basándose en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{9,10,11} que permite detectar cantidades muy pequeñas de DNA fúngico ya sea a partir de colonias (Haynes y Cols.)¹² o directamente a partir de muestras clínicas (Sandhu y Cols.)¹³.

El primer paso para ello es la extracción del DNA fúngico mediante un método sencillo como son los que emplean calor y un reactivo alcalino para romper la pared fúngica y posterior extracción con disolventes orgánicos para purificar el DNA.

El siguiente paso consiste en la amplificación mediante PCR de una región del DNA con oligonucleótidos específicos y por último la identificación del producto de amplificación y por tanto de la especie de *Candida* estudiada.

Existen una gran diversidad de protocolos para llevar a cabo cada uno de los pasos anteriores. Así, son muchos los métodos de extracción que se pueden usar. La amplificación se puede realizar sobre distintos DNA diana; Buchman y Cols.¹⁴ empleaban

oligonucleótidos que amplificaban secuencias que codifican dianas para los antifúngicos, este método presentaba una baja sensibilidad y selectividad. Reiss y Cols.¹⁵ usaban

secuencias repetitivas específicas del DNA fúngico y en publicaciones recientes, autores como Hopfer y Cols.¹⁶ usan oligonucleótidos que amplifican secuencias altamente conservadas del DNA que codifican rRNA y se encuentran en un gran número de copias por genoma con lo que la especificidad es muy elevada.

La identificación del producto de PCR se realiza generalmente por hibridación con una sonda específica de especie¹³ o por el tamaño del producto obtenido ya que se conoce la secuencia del fragmento que amplificamos; aunque existen otros métodos.

Otros autores como Lehmann y Cols.¹⁷ o Liu y Cols.⁹ emplean la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) que es una técnica de amplificación que a diferencia de la PCR utiliza un único oligonucleótido inespecífico de corta secuencia que permite obtener un gran número de productos de amplificación de forma reproducible, para identificar siete especies aisladas con gran frecuencia de *Candida spp.* basándose en el patrón de bandas de DNA, característico de cada especie.

Se trata de una técnica rápida, sensible y específica para el diagnóstico de las candidiasis que permite identificar no sólo *C. albicans* sino también otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

Se pretende conseguir una automatización completa del proceso en todas sus fases (extracción, amplificación y detección) y medidas adecuadas de control de calidad y estandarización para su aplicación de rutina en los laboratorios clínicos.

RESUMEN

Considerando el gran aumento de infecciones fúngicas sobre todo en pacientes inmunodeprimidos en las últimas décadas, se realiza una revisión de las técnicas diagnósticas utilizadas hoy en día en los laboratorios de Microbiología Clínica y de técnicas que en un futuro nos permitirán llegar a un diagnóstico de forma rápida y específica.

Palabras clave: *Candida*, Diagnóstico, PCR.

SUMMARY

Considering about the great increase of fungal infections above all in immunocompromised patients, a review of the diagnostic techniques used now in the laboratories of clinical microbiology and methods which in the future, will enable a rapid and specific diagnosis.

Key Words: *Candida*, Diagnosis, PCR.

BIBLIOGRAFIA

1. WARREN NG., HAZEN KC.: *Candida, Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. En: MURRAY PR., BARON EJ., PFALLER MA., TENOVER FC., YOLKEN RH. Manual of Clinical Microbiology. 6a. Ed., 1995.
2. PEREIRO-MIGUENS M., PEREIRO-FERREIRÓS M.: Candidosis cutaneomucosas. En: TORRES-RODRÍGUEZ JM., GUARRO-ARTIGAS JA., y Cols. Micología Médica. Ed. Masson. Barcelona, 1994.
3. 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. 34: 454-456, 1996.
4. MATTHEWS RC.: Comparative assessment of the detection of candidal antigens as a diagnostic tool. J. Med. Vet. Mycol. 34: 1-10, 1996.
5. MITSUTAKE K., MIYAZAKI T., TASHIRO T. y Cols.: Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. J. Clin. Microbiol. 34: 1918-19921, 1996.
6. SCHUFFENECKER I., FREYDIERE A., MONTCLOS H. y Cols.: Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 255-260, 1993.
7. HOPFER RL.: Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. Arch. Med. Res. 26: 287-292, 1995.
8. ZERVOS MJ., VAZQUEZ JA.: DNA analysis in the study of fungal infections in the immunocompromised host. Clin. Lab. Med. 16: 7387, 1996.
9. LIUD., COLOES., JONES LL. y Cols.: Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. FEMS. Microbiol. Lett. 145: 23-26, 1996.
10. SULLIVAN DJ., HENMAN MC., MORAN GP. y Cols.: Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. J. Med. Microbiol. 44: 399-408, 1996.
11. WALSH TJ., FRANCESCONI A., KASAI M. y Cols.: PCR and singlestrand conformation-I polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J. Clin. Microbiol. 33: 3216-3220, 1995.
12. HAYNES KA., WESTERNENG TJ., FELL JW. y Cols.: Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. J. Med. Vet. Mycol. 33: 319-325, 1995.
13. SANDHU GS., KLINE BC., STOCKMAN L. y Cols.: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J. Clin. Microbiol. 33: 2913-2919, 1995.
14. BUCHMAN TG., ROSSIER M., MERZ WG. y Cols.: Detection of surgical pathogens by in vitro DNA. Part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus specific gene. Surgery 108: 338-346, 1990.
15. REISS E., MORRISON CJ.: Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin. Microbiol. Rev. 6: 311, 1993.
16. HOPFER RL., WALDEN P., SETTERQUIST S. y Cols.: Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. J. Med. Vet. Mycol. 31: 65-75, 1993.
17. LEHMANN PF., LIND., LAKER BA.: Genotype identification and characterisation of species and strains with genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. 30: 3249-3254, 1992.

Correspondencia:

María del Carmen Rodríguez Cerdeira Servicio de Dermatología. Hospital do Meixoeiro. 36200 Vigo (Pontevedra). Galicia (España).

Tratar bem é lutar pela vida.

0800 61 2437
Pergunte
Aids



VISITE
NOSSA HOME PAGE

<http://www.uff.br/dst/>

VISIT
OUR HOME PAGE

BIREME - Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Organização Pan-Americana de Saúde Organização Mundial de Saúde

Rua Botafogo 882-Vila Clementina, CEP 04023-001 - São Paulo, SP, Brasil - Tel.: 55-11-576-5800 - Fax: 55-11-571-1910

REF: BRM-ABO- 435 /97

São Paulo, 22 de dezembro de 1997.

Ao Editor de
JB-DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis
Rua Hernani de Melo, 101 - Anexo - Centro
24210-130 - Niterói/RJ

Prezado Editor,

Informamos que a publicação JB-DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, editada por sua instituição, reúne requisitos para ser indexada na base de dados LILACS - Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde. Para que seja indexada é necessário que a BIREME continue recebendo-a de forma regular e gratuita, no menor tempo possível a partir do v.9(4), 1997.

Como a indexação é descentralizada, consultamos V.Sª sobre a possibilidade de enviar também um exemplar dos novos fascículos editados ao Centro Cooperante que fará sua indexação. A remessa deverá ser gratuita, por via aérea e imediatamente após sua publicação. Em caso de resposta afirmativa, a BIREME informará o endereço do Centro.

Certos de contar com sua colaboração,

Atenciosamente,

Regina C. Figueiredo Castro
Administração das Bases de Dados