

3.1 DETECCIÓN DE *Candida* spp COMO PATÓGENO EMERGENTE: TAXONOMÍA CLÁSICA VS HERRAMIENTAS MOLECULARES.

Duque Clara¹, Hernández Orville²

1. Profesora Facultad de Ciencias de la Salud. Grupo Investigación Biociencias. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.
2. Profesor asociado, Escuela de Microbiología UdeA. Líder del grupo de Biología Celular y Molecular UdeA-CIB

Resumen

El aumento en la incidencia de infecciones causadas por *Candida* spp., es una causa importante de morbilidad y mortalidad. *Candida* spp es el patógeno fúngico más frecuente en formas invasivas. Los métodos microbiológicos son la forma clásica de identificar *Candida* spp , estas herramientas son limitadas (sensibilidad, oportunidad entre otras), para superar estas limitaciones, se han desarrollado métodos de identificación moleculares.

Palabras clave: *Candida*, métodos microbiológicos, herramientas moleculares

Introducción

El término Candidiasis hace referencia a Infecciones diversas producidas por levaduras del género *Candida*, las manifestaciones clínicas son agudas, subagudas o crónicas.

Patogenia

Para el desarrollo de la candidiasis son necesarias la adhesión, colonización e invasión del hongo desde la piel o mucosas en la forma endógena y del medio ambiente en la exógena. La colonización se da por el sobrecrecimiento de las especies de *Candida* spp en las mucosas y en las superficies cutáneas. La *Candida* spp también puede translocarse a través de la barrera intestinal o diseminarse por vía hematógena. Entre los factores de virulencia, la adherencia y el pleomorfismo son las características más importantes; las adhesinas, permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedero o a materiales plásticos, como las prótesis y los catéteres , el pleomorfismo, favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedero, otros factores de virulencia son : la producción de enzimas de tipo hidrolítico (las más estudiadas son aspartil proteinasas, fosfolipasas y estererasas que son favorecedoras de la diseminación por los tejidos), las integrinas, la presencia de esteroides de membrana; de manoproteínas y de oligosacáridos con efectos inhibitorios de macrófagos además de la producción de toxinas con efectos citotóxicos(1) y la formación de biopelículas , las infecciones relacionadas con las biopelículas de *Candida albicans* y la resistencia antifúngica posterior se han vuelto más comunes con el uso cada vez mayor de dispositivos médicos permanentes. (2)

Entre los principales factores de riesgo para desarrollar una candidiasis invasora están; uso de antibióticos, esteroides, diabetes mellitus, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas, alteraciones locales del sistema gastrointestinal, factores iatrogénicos, UCI, catéteres, dispositivos médicos, extremos de la vida.

Candida spp es el patógeno fúngico más frecuente del torrente sanguíneo sin embargo hay diferencias notables en la virulencia entre las diversas especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más virulenta (3). Para su adecuado diagnóstico se requiere de un elevado nivel de sospecha y la adecuada valoración de factores de riesgo, síntomas y signos clínicos, así como de la presencia

de colonización por *Candida* en otros sitios. (4). La candidiasis invasiva es una infección asociada a la atención en salud, aunque *C. albicans* es la especie de aislada con mayor frecuencia en Candidiasis invasiva, también se detectan comúnmente especies de *Candida* no *albicans*.

En el paciente hospitalizado, con infección urinaria complicada, sonda urinaria y antibioticoterapia previa, la *Candida* spp es un patógeno frecuente, el diagnóstico de las infecciones urinarias por *Candida* es muy delicado, ya que la presencia de esta en la orina puede ser el primer signo de infección sistémica. Son un grave problema en el manejo adecuado de los pacientes tanto por la morbimortalidad, como por la falla terapéutica debida a la resistencia, varios autores han realizado estudios de las infecciones urinarias encontrando en las candidurias un problema creciente, que requiere atención. (5,6)

Diagnóstico

Métodos Microbiológicos

Características de crecimiento

- Estas levaduras crecen en Agar Sabouraud con o sin cicloheximida, a 37 °C después de 48 horas de incubación. Sus colonias son cremosas, no pigmentadas y filamentosas. Además pueden producir blastoconidias con pseudohifas, e hifas verdaderas como en *C. albicans*.
- Características de crecimiento en Medios cromogénicos. El uso del medio cromogénico CHROMAgar *Candida* permite un diagnóstico presuntivo de especie; a partir de una colonia verde intensa se sospecha la posibilidad de *C. albicans*.
- Producción de clamidosporas: en medio agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria
- Producción de tubo germinal: El tubo germinal es la extensión filamentosas de una levadura, esta se produce cuando la levadura se suspende en suero o plasma y se incuba a 35°C por espacio de 2 horas.
- Asimilación de Carbohidatos: para identificación de especie: Glucosa, galactosa, maltosa, sucrosa, D-manitol, sorbitol, L-arabinosa, D-xilosa, D-ribosa, L-sorbosa, L-ramnosa, celobiosa, lactosa, rafinosa, glicerol, inositol, DL-ácido láctico, DL-lactato, gluconato, 2-ceto-gluconato, Nacetilglucosamina, glucosamina.
- Sistemas comerciales: existen varios en el mercado que permiten la identificación de especies como el API ID 32C, API 20C AUX, RapID Yeast Plus, VITEK YBC y VITEK 2, esta identificación es fundamental para el diagnóstico y la instauración de un adecuado tratamiento para el paciente. Zuluaga y colaboradores realizaron estudio comparando diferentes metodologías usadas para la identificación de *Candida* spp en Colombia. Los métodos incluidos fueron: API® 20 C AUX, Vitek® 2 Compact, MALDI TOF (Vitek® MS y Microflex®) y una prueba molecular, PCR Panfungal y secuenciación y concluyeron que: Los métodos evaluados presentaron una alta concordancia en sus resultados, siendo más alta para los métodos moleculares y las metodologías basadas en MALDI TOF MS; estas últimas son metodologías más rápidas, económicas y precisas.
- Los hemocultivos son fundamentales en el diagnóstico de la CI. Para optimizar su rendimiento deben obtenerse dos o tres muestras mediante punción de vía periférica, en cantidad superior a 20 ml, y ser procesadas por métodos automatizados. el valor predictor de candidemia de sólo un cultivo positivo es alto y requiere tratamiento. Si el hemocultivo

está asociado a presencia de catéter venoso central, éste debe ser retirado. La sensibilidad de los métodos microbiológicos (hemocultivo automatizado) es baja ,alcanza alrededor de 50 a 60%. Además el tiempo de demora entre la toma de la muestra y el aislamiento e identificación de la especie de *Candida*, es de 72 a 96 horas. (4) En la actualidad, el hemocultivo es la prueba diagnóstica esencial a pesar de tener un tiempo de detección prolongado y una baja tasa de sensibilidad. Estudio realizado en 2017 por Gokbolat encontró que el tiempo de positividad de los hemocultivos se vio afectado por especies de *Candida*, carga fúngica y tipo de botella. (8)

Patrón de sensibilidad

Los métodos de referencia de microdilución en caldo de la CLSI M27-A2 y EUCAST, son empleados para evaluar perfil de sensibilidad de los aislamientos clínicos de *Candida* spp a los agentes antifúngicos y el Método de difusión en disco, estandarizado (documento M-44-A2, CLSI). Además los Métodos comerciales aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), de Estados Unidos, para medir susceptibilidad antifúngica en *Candida* son : Sensititre YeastOne colorimetric plate (TREK Diagnostic Systems), Vitek 2 yeast susceptibility test (bioMerieux, Inc.), Etest (bioMerieux). Los casos en los que se debe realizar estudio de susceptibilidad en infecciones por *Candida* : • Aislados de *Candida* spp provenientes de sitios estériles, pacientes con infecciones que no responden a terapia o que presentan infección por *Candida* spp mientras se encuentran en profilaxis o tratamiento antifúngico. En pacientes con infecciones recurrentes por *Candida* spp o con antecedentes de tratamientos prolongados con azólicos.(4)

Candida auris es un patógeno asociado a la atención en salud, multiresiste, con altas tasas de fracaso del tratamiento y mortalidad. Se considera una grave amenaza para la salud pública mundial, se presentan dificultades en el diagnóstico por los métodos convencionales de laboratorio, incluido el Vitek2 e incluso MALDI-TOF MS (9) Estudio realizado en Bélgica mostro datos que confirman altas tasas de identificaciones erróneas en el caso de *C. auris* con métodos de identificación comúnmente utilizados (10)

El diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora se basa en la demostración de la invasión tisular por *Candida* spp, el cultivo del hongo en localizaciones corporales habitualmente estériles y en la detección de una serie de marcadores biológicos que incluyen, el manano, el β -1,3-D-glucano que es un antígeno fúngico con un tiempo de respuesta rápido. Chibabhai realizó estudio en South Africa para evaluar la sensibilidad general del ensayo la cual fue del 79%. La sensibilidad por especie fue del 81% para *C. albicans*, 72% para *C parapsilosis*, 90% para *C. glabrata*, 71% *C. auris* y 100% para *C. krusei*. Estudio realizado por Guitard y col de la utilidad del Beta D glucan (BDG) en pacientes con neoplasia hematológica concluyo que exhibe una baja sensibilidad en este grupo de pacientes.(11)

Técnicas moleculares para la identificación de especies de Candida.

Para justificar un poco la implementación de técnicas moleculares en la identificación de hongos involucrados en infección en humanos, incluyendo especies del género *Candida*, podemos partir de tres verdades fundamentales: i) Los hongos son las formas de vida mas diversas filogenética y funcionalmente, pues actúan como patógenos de humanos, de animales y de plantas, hacen parte de la microbiota de humanos y actúan como descomponedores. ii) Se estima alrededor

de 1.5 millones de especies, de las cuales sólo 5-10% han sido identificadas. iii) La diversidad fúngica es desconocida y no descrita aún.

Soportados en las afirmaciones anteriores, podemos concluir que aunque los métodos basados en la morfología son la forma clásica de identificar especies de hongos, estas herramientas son limitadas, pues las estructuras reproductivas son producidas inconsistentemente, (generalmente debemos estimular la esporulación), lo que no siempre es efectivo, tampoco suficiente para identificar a nivel de especie el hongo aislado. Adicionalmente, los cultivos axénicos para determinar la diversidad son altamente selectivos; sólo el 17% de las 70.000 especies descritas han sido cultivados exitosamente.

Para superar las limitaciones impuestas por la morfología y la capacidad de crecimiento de los hongos en medios de cultivo, se han desarrollado métodos de identificación moleculares. Estos métodos se basan generalmente en la identificación de regiones genómicas con secuencias de ADN conservadas entre clados, géneros o especies. Una vez identificadas estas regiones se pueden diseñar iniciadores que flanquean regiones variables o conservadas, las cuales útiles para la implementación de estrategias basadas en la amplificación de ADN; estos productos de amplificación son empleados para la identificación directa o para la secuenciación de esta, lo que permite la identificación final, inclusive a nivel de especie o variantes.

Las técnicas moleculares son generalmente fáciles de usar, rápidas, automatizadas, tienen alta sensibilidad y especificidad, son de bajo costo, amigables para el ambiente, más rápidas/sensibles/económicas que las pruebas convencionales, más seguros para laboratoristas, pues reducen la necesidad de manipular cultivos de hongos peligrosos. Lo anterior constituye un valor agregado en el proceso de identificación de especies de importancia clínica. Existen varias estrategias para la detección de diferentes moléculas:

- Para la detección de ADN (PCR, PCR-*Multiplex*, PCR anidada, qPCR, PNA Fish).
- Para la detección de ARN (NASBA, 3SR, TMA, qPCR)
- Para la detección de proteínas (Western Blot, ELISA) MALDI-TOF MS

Sin embargo, en micología clínica, la implementación estrategias moleculares basadas en PCR, tiene ciertas limitaciones, pues la estandarización de blancos moleculares es aún insuficiente, además es necesario estandarizar mejor los protocolos de extracción de material genético o la detección del mismo directamente de las muestras clínicas y finalmente no existe un consenso aún para definir el tipo de muestra, blanco y la técnica a ser usada. (13)

Las regiones ITS del ADNr pueden ser usadas como blanco para el diseño e implementación de pruebas moleculares, pues son regiones divergentes en secuencia y longitud, poseen bajo nivel de variación intraespecífica y alto nivel de variación interespecífica, lo que permite en muchos casos clasificar hasta nivel de especie el hongo objeto de estudio. Adicionalmente, el ADNr está presente en múltiples copias, lo que favorece la sensibilidad y mejora el límite de detección del microorganismo presente en la muestra. Se puede considerar la PCR como una Técnica fundamental para identificación de regiones específicas que se pueden emplear para la identificación a nivel de género, especie, aislamientos de *Candida*. Para muestras con baja carga micótica, se emplean variantes como PCR anidada (Nested PCR), con la cual se aumenta la sensibilidad sin sacrificar especificidad.

Los hongos, especialmente *Candida spp.* hacen parte de nuestro ambiente natural, por lo tanto estamos expuestos constantemente a ellos. Si consideramos que las pruebas moleculares son muy sensibles (amplifican mínimas cantidades de ADN) se puede detectar ADN de pacientes sanos o con bajas cargas micóticas; por lo tanto se hace necesario diferenciar colonización de infección activa. Para esto se emplean métodos moleculares cuantitativos que detectan y cuantifican concentraciones de ADN en muestras clínicas; además permiten monitorear el efecto terapéutico y posiblemente predecir el curso o resultado de la infección. Estos métodos como la PCR en tiempo real han sido implementados como estrategias para el diagnóstico clínico por el laboratorio. Aunque existen varias herramientas, puede considerarse que hasta el momento la qPCR es la herramienta más poderosa para el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos, pues tiene como ventajas: alta sensibilidad, adecuada especificidad, es muy reproducible, Se realiza en corto tiempo (en algunos equipos no más de 40'), hay poca manipulación de la muestra y tiene múltiples aplicaciones (ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple). Sin embargo, en la qPCR se pueden resaltar varias desventajas: altos costos, errores de manipulación, es necesario en diseño de normalizadores y/o controles, Se debe estimar la cantidad inicial y es una tecnología relativamente compleja. (14)

Otra técnica actualmente empleada para la identificación de especies de *Candida*, es el MALDI-TOF (MALDI=Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (Desorción/ionización láser asistida por matriz) (TOF=Time of flight= Detector de iones que se acopla al MALDI). Esta tecnología permite el análisis de biomoléculas que tienden a hacerse frágiles y a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos convencionales. Ioniza las moléculas a través de pulsos de láser y posteriormente separa las moléculas de acuerdo a la relación carga/masa, posteriormente analiza las moléculas y las compara con una base de datos que permite a partir del perfil generado identificar inclusive a nivel de género el microorganismo analizado. (15)

La *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) es una técnica citogenética diseñada para detectar y localizar la presencia/ausencia de secuencias de ADN o ARN específicas en cromosomas. Esta es una detección *in situ* de microorganismos creciendo activamente en el tejido y puede visualizarse la ubicación precisa de secuencias de ADN o ARN en el citoplasma, organelas, o núcleo de células de hongos como *Candida* presentes en materiales biológicos. Los pasos básicos para el desarrollo de esta técnica son: i) Frotis de la preparación, ii) Hibridación con las sondas de ADN/ARN, iii) Lavado que remueve la sonda no unida y finalmente iv) Lectura en la placa en el microscopio de fluorescencia.

Existen una serie de pruebas comerciales que permiten la identificación molecular de diversas especies de hongos, incluyendo especies del género *Candida*. Se referencian a continuación:

Esnsayo	Método	Blanco	Tipo de Muestra
Yeast Traffic Light®	PNA-FISH	26S rRNA; <i>Candida</i> sp	Sangre (de hemocultivos positivos)
Luminex xTAG®fungal assay	PCR multiplex	Más de 23 hongos	LBA, sangre
IBIS Plex-ID fungal spectrum assay	PCR multiplex acoplada con ESI-MS	Large-subunit rRNA; up to 75 fungi	LBA, sangre
Seeplex®ACE PCR system	PCR multiplex acoplada con detección por fluorescencia	<i>Candida</i> sp.	Sangre
RenDx™ Fungiplex panel	PCR Multiplex	Más de 50 hongos	Sangre
ICEPlex 16-plex fungal panel	PCR multiplex	Multiples hongos	Sangre
Prove-it™ sepsis assay	PCR multiplex acoplada con microarreglos	ITS, <i>Candida</i> sp.	Sangre
T2 <i>Candida</i> ®	Nanopartículas y plataforma de detección de resonancia magnética T2	ITS2	Sangre

Conclusiones:

Entre los principales retos en el diagnóstico de *Candida* se encuentran: La oportunidad diagnóstica, la identificación correcta de especies no albicans la identificación de *Candida auris* y la detección de resistencias de forma confiable, esto mediante pruebas convencionales o la implementación de pruebas moleculares que en muchos casos han mostrado ser bastante apropiadas para cumplir con los retos del diagnóstico de esta levadura de importancia clínica.

Bibliografía

1. Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Przegl Epidemiol.* 2012; 66(4):629-33.
2. Turan H, Demirbilek M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Rev Argent Microbiol.* 2018 Jan - Mar;50(1):62-69. doi: 10.1016/j.ram.2017.05.003. Epub 2017 Oct 6.
3. Arendrup MC. *Candida* and candidemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* 2013 Nov; 60(11):B4698.
4. Tobar A Eduardo, Silva O Francisco, Olivares C Roberto, Gaete G Pablo, Luppi N Mario. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2011 Feb [citado 2019 Sep 22]; 28(1): 41-49. Disponible https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000100008&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000100008>.

5. Yashavanth R., Shiju M.P., Bhaskar U.A., Ronald R., and Anita K.B. Candiduria: prevalence and trends in antifungal susceptibility in a tertiary care hospital of mangalore. *J Clin Diagn Res.* 2013 Nov;7(11):2459-61. doi: 10.7860/JCDR/2013/6298.3578. Epub 2013 Nov 10.
6. Osawa K1, Shigemura K, Yoshida H, Fujisawa M, Arakawa S. Candida urinary tract infection and Candida species susceptibilities to antifungal agents. *J Antibiot (Tokyo).* 2013 Nov;66(11):651-4. doi: 10.1038/ja.2013.68. Epub 2013 Jun 26.
7. Zuluaga A et al. Análisis de concordancia de diferentes metodologías para la identificación de aislamientos orales de especies de Candida. *Colombia Médica - Vol. 49 N°3 2018 (Jul-Sep)*
8. Gokbolat E, Oz Y, Metintas S. Evaluation of three different bottles in BACTEC 9240 automated blood culture system and direct identification of Candida species to shorten the turnaround time of blood culture. *J Med Microbiol.* 2017 Apr;66(4):470-476. doi: 10.1099/jmm.0.000434. Epub 2017 Apr 28.
9. Crea F, Codda G, Orsi A, et al. Isolation of *Candida auris* from invasive and non-invasive samples of a patient suffering from vascular disease, Italy, July 2019. *Euro Surveill.* 2019 Sep;24(37). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1900549.
10. Dewaele K, Lagrou K, Frans J, Hayette MP, Vernelen K. Hospital Laboratory Survey for Identification of *Candida auris* in Belgium. *J Fungi (Basel).* 2019 Sep 5;5(3). pii: E84. doi: 10.3390/jof5030084.
11. Chibabhai V, Fadana V, Bosman N, Nana T.²Comparative sensitivity of 1,3 beta-D-glucan for common causes of candidaemia in South Africa.. *Mycoses.* 2019 Aug 8. doi: 10.1111/myc.12982. [Epub ahead of print
12. Guitard J, Isnard F, Tabone MD, et al. Usefulness of β -D-glucan for diagnosis and follow-up of invasive candidiasis in onco-haematological patients. *J Infect.* 2018 May;76(5):483-488. doi: 10.1016/j.jinf.2018.01.011. Epub 2018 Feb 9.
13. Lynch T, Peirano G, Lloyd T, Read R, Carter J, Chu A, Shaman JA, Jarvis JP, Diamond E, Ijaz UZ, Church D. Molecular Diagnosis of Vaginitis: Comparing Quantitative PCR and Microbiome Profiling Approaches to current Microscopy Scoring. *J Clin Microbiol.* 2019 Aug 26;57(9)
14. Fuchs S, Lass-Flörl C, Posch W. Diagnostic Performance of a Novel Multiplex PCR Assays for Candidemia among ICU Patients. *J Fungi (Basel).* 2019 Sep 17;5(3)
15. Xie TA, Liu YL, Liang C, Huang YY, Li JW, Li ZW, Fan SJ, Chen JT, Xia Y, Li XY, Ouyang S, Ji TX, Guo XG. Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Candida. *Biosci Rep.* 2019 Sep 19. pii: BSR20190859. doi: 10.1042/BSR20190859