

Práctica Electiva:

**“DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA DE COMPLEJO
Candida albicans Y *Candida dubliniensis* EN MUESTRAS
DE EXUDADOS VAGINALES”**

Alumna: Pérez, Camila Evelyn

Directora: Bioq. Echarri, Mariela Alejandra

Co-directora: Bioq. Goiburú, Noelia Elizabeth

Colaboradoras: Bioq. Rizzotti, Mariana Andrea, Bioq. Sacramone, Carina Andrea, Bioq. Papini, Ruth Elizabeth.

Institución: Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco “Dra. Francisca Cledi Luna de Bolsi”

Carrera: Bioquímica

Año: 2022

Índice

INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	4
▪ OBJETIVOS GENERALES.....	4
▪ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
MATERIALES.....	4
PROCEDIMIENTO.....	5
RESULTADOS.....	6
DISCUSIÓN	7
CONCLUSIÓN.....	8
BIBLIOGRAFÍA	8
ANEXO	10

Introducción

La candidiasis vaginal es una causa frecuente de morbilidad en mujeres en edad fértil producida por diferentes especies del género *Candida*, las cuales son consideradas patógenos oportunistas. Los factores de virulencia que contribuyen a su patogénesis son: adherencia a las células del huésped, cambio de morfología (de levadura a hifa o pseudohifa), switch o variabilidad fenotípica (cambio de la morfología colonial, diferencia en la antigenicidad, adherencia, etc.), secreción de enzimas, formación de biofilm (1).

Los síntomas no son específicos y se pueden asociar a otras infecciones vaginales. Los más frecuentes son: prurito (casi 90% casos), eritema vulvar acompañado de enrojecimiento, irritación y una secreción vaginal característica de aspecto grumoso, color blanco-amarillento, sin olor característico (2).

Los factores predisponentes para desarrollar candidiasis vulvovaginal son: embarazo, utilización de antibióticos, anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, diabetes mellitus, inmunosupresión, aumento del pH vaginal (ejemplo: durante período menstrual y presencia de semen en las relaciones sexuales). Los factores ambientales vaginales que favorecen la infección son humedad, calor, fricción y el uso de ropa interior de materiales sintéticos (1).

La especie más frecuentemente aislada en episodios de candidiasis vulvovaginal (alrededor de 85% casos) pertenece al Complejo *C. albicans*, pero también Complejo *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *Pichia kudriavzeii* (*C. krusei*) y Complejo *C. parapsilosis*, pueden estar implicadas, aunque con menor frecuencia (3).

En 1995, en Dublín, Irlanda, Sullivan y colaboradores describieron una nueva especie de *Candida*, asociada con lesiones orales de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), a la que denominaron *Candida dubliniensis* y que se encuentra relacionada filogenéticamente con *Candida albicans*. Posteriormente, se hicieron reportes de su presencia en otras muestras clínicas en pacientes con y sin HIV. Ambas especies comparten características morfológicas, fisiológicas y presentan patrones bioquímicos similares lo que dificulta su diferenciación, la cual se realiza a través de pruebas genotípicas (de difícil acceso en los laboratorios de microbiología clínica) y fenotípicas (4).

Además de presentar un color similar en medios con sustratos cromogénicos, ambas especies tienen la capacidad de formar tubos germinativos y clamidoconidias en los medios habituales (agar leche, agar arroz, agar harina de maíz con Tween 80). Sin embargo, una de las características que las diferencia es la capacidad de desarrollar resistencia frente a fluconazol que tiene *C. dubliniensis*, lo cual la hace importante desde el punto de vista clínico ya que involucra el éxito o el fallo terapéutico (4).

Las pruebas más confiables para distinguirlas son las basadas en técnicas moleculares, pero la mayoría de los laboratorios no tienen acceso a ellas, por lo que el desarrollo de técnicas fenotípicas es de gran utilidad. Varios autores han demostrado que los medios que contienen extractos de semillas y plantas tales como tabaco y extracto de semilla de girasol bajo ciertas condiciones de cultivo son capaces de diferenciar Complejo *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la observación macro y microscópica (4,5,6).

En nuestro país no existe aún mucha información acerca de la prevalencia de *C. dubliniensis* en distintas instituciones asistenciales (4).

En el presente trabajo se evaluaron métodos fenotípicos como las características morfológicas de las colonias en el medio agar tabaco, agar semilla de girasol y la observación microscópica de clamidoconidias con el fin de determinar cuáles permiten diferenciar ambas especies con el fin de lograr un tratamiento adecuado.

Objetivos

■ Objetivos generales

- Diferenciar Complejo *C. albicans* de *C. dubliniensis* en muestras de exudados vaginales.
- Adquirir competencias técnicas y metodológicas en el trabajo de mesada en el área de microbiología en un laboratorio de atención ambulatoria.
- Adquirir experiencia en la búsqueda bibliográfica y redacción de un informe final, siguiendo pautas preestablecidas.

■ Objetivos específicos

- Adquirir conocimiento de las características diferenciales de las especies de levaduras estudiadas en medios de cultivos y de sus particularidades microscópicas.
- Adquirir habilidad y destreza en las distintas técnicas microbiológicas y el uso del microscopio óptico.
- Conseguir entrenamiento en la lectura e interpretación de trabajos científicos.
- Comparar los datos obtenidos con antecedentes encontrados en la bibliografía.

Materiales

Cepas

Se analizaron 741 cepas de *Candidas* spp. de muestras de exudados vaginales de pacientes ambulatorias obtenidas durante el año 2020 en el Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco “Dra. Francisca Cledi Luna de Bolsi”, las cuales fueron conservadas a - 8°C en tubos eppendorf estériles con agua glicerinada al 20%. La selección de las mismas fue de acuerdo al color que desarrollaron en el CHROMagar™ Candida, incluyendo todas aquellas que producían colonias con diferentes tonalidades de color verde (4,8) (Fig. 1).

Además, se utilizaron como control cepas de Complejo *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* proporcionadas por el Instituto Nacional de Referencia – ANLIS - “Dr. Carlos G. Malbrán” (Fig. 2).



Figura 1. Medio CHROMagar Candida para las diferentes especies de *Candidas*.



Figura 2. Controles Complejo *C. albicans* (verde claro) y *C. dubliniensis* (verde esmeralda). Medio CHROMagar Candida.

Medios de cultivo para diferenciación

- *Agar tabaco Marlboro (ATM) y agar tabaco hoja (ATH)*

Permiten la detección de la enzima fenoloxidasa producida por *Cryptococcus neoformans*. Esta reacción tiene como producto final la melanina, la cual le da al hongo una coloración marrón característica. *C. dubliniensis* se caracteriza por presentar colonias rugosas, secas, de color marrón y clamidoconidias en racimos, mientras que en Complejo *C. albicans* se observan colonias cremosas, lisas de color blanco y escasas o nulas clamidoconidias.

El método utilizado para la preparación del agar tabaco fue el mismo descrito por Tendolkar (6) que utiliza hojas de tabaco, en este caso hojas de tabaco de la marca “Las hojas”; y el método de Khan (6) que utiliza tabaco para cigarrillos en lugar de hojas de tabaco, en este trabajo se usó cigarrillos de la marca Marlboro®. Para ello, se mezclaron 50 g de tabaco con 1 litro de agua destilada. La mezcla se hirvió durante 30 min y luego se filtró a través de gasa. A este filtrado se añadieron 20 g de agar y se completó el volumen hasta 1 litro con pH final de 5,4. Se autoclavó a 121°C por 15 min. Se vertieron veinte mililitros de medio en cada placa de Petri (90 mm de diámetro).

- *Agar semillas de girasol (ASG)*

El medio contiene ácido cafeico que permite la detección de la enzima fenoloxidasa, cuyo fundamento es igual al del agar tabaco.

La preparación del agar consistió primeramente en la obtención del extracto de semilla de girasol (pulverizar las semillas de girasol, pesar 70 g del mismo y suspenderlo en 350 ml de agua destilada, hervir y filtrar por gasa. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos), luego se agregó 1 g de glucosa, 0,78 g de creatina y 18 g de agar. Por último, se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

Procedimiento

- 1) Se retiraron las cepas (muestras y controles) guardadas en el freezer (- 8°C) dejando a temperatura ambiente (Fig. 3).



Figura 3.

- 2) Se registró en una planilla la identificación de las cepas y el mes de aislamiento.
- 3) Se sembraron las muestras por estrías en Agar Sabouraud previa homogenización en vortex. Se incubaron a 37°C durante 48 h (Fig. 4).



Figura 4.

- 4) Se repicaron las colonias en agar tabaco Marlboro, agar tabaco hoja y agar semillas de girasol. Se incubaron a 28 °C durante 48 h.
- 5) Se analizaron las características de las colonias: el color (blanco o marrón) y el aspecto (liso o rugoso).
- 6) Se realizó la observación microscópica de las colonias en solución fisiológica entre portaobjetos y cubreobjetos a 400X y se registró la presencia o ausencia de clamidoconidias.
- 7) Se registraron los datos obtenidos en una planilla de trabajo.
- 8) Las cepas que no presentaron concordancia tanto en el color como en el aspecto se estudiaron por metodología automatizada PHOENIX™ 100.

Resultados

Los resultados de las distintas pruebas fenotípicas relativas a los aspectos macro y microscópicos de las colonias de los controles se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1 Características fenotípicas correspondientes a los controles de Complejo *C. albicans* y *C. dubliniensis* en los distintos medios de cultivos ensayados.

	Complejo <i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Aspecto y color de la colonia		
Agar tabaco Marlboro (ver ANEXO figura 1)	Crema y blanca	Marrón claro, rugosa y seca con bordes irregulares (flecos)
Agar tabaco hoja (ver ANEXO figura 1)	Crema y blanca	Marrón fuerte, rugosa y seca con bordes irregulares (flecos)
Agar semillas de girasol	Crema y blanca	Blanca, seca con bordes irregulares (flecos)
Formación de clamidoconidias	(Ver ANEXO figura 6)	(Ver ANEXO figura 5)
Agar tabaco Marlboro	No	Abundante, en racimos
Agar tabaco hoja	No	Abundante, en racimos
Agar semillas de girasol	No	Abundante, en racimos

Del total de 741 muestras sembradas, en 9 de ellas no hubo crecimiento y los resultados de las distintas pruebas fenotípicas relativas a los aspectos macro y microscópicos de las muestras en las que si hubo crecimiento se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de las características fenotípicas obtenidas en los distintos medios de cultivos ensayados.

	Agar tabaco Marlboro	Agar tabaco hoja	Agar semillas de girasol
Colonia blanca y cremosa <i>sin</i> formación de clamidoconidias	725 (90,04%)	717 (97,95%)	725 (90,04%)
Colonia blanca y cremosa <i>con</i> formación de clamidoconidias	-	2* (0,27%)	-
Colonia blanca y seca <i>con</i> formación de clamidoconidias	-	-	7 (0,96%)
Colonia marrón, rugosa y seca <i>sin</i> formación de clamidoconidias	-	6* (0,82%)	-
Colonia marrón, rugosa y seca <i>con</i> formación de clamidoconidias	7 (0,96%)	7 (0,96%)	-
TOTAL		732 (100%)	

*Ocho cepas que no presentaron concordancia con las características fenotípicas que presentan ambas especies, fueron identificadas por metodología automatizada PHOENIX™ 100 como *C. tropicalis*.

Discusión

Las cepas identificadas como *C. dubliniensis* no produjeron el cambio esperado de color o el viraje fue muy leve en el medio agar semillas de girasol; sin embargo, se pudo observar que aquellas colonias blancas secas y con flecos (ver ANEXO figura 2) produjeron clamidoconidias en racimo comparables con el control correspondiente a *C. dubliniensis*.

Comparando el agar tabaco hoja (ATH) con el agar tabaco Marlboro (ATM), se pudo observar que en ATH el cambio de color fue más evidente (ver ANEXO figura 3), pero algunas de éstas produjeron clamidoconidias en escasa cantidad o sin producción. Por otro lado, aislamientos de color blanco y aspecto cremoso en este mismo medio produjeron abundante cantidad de clamidoconidias. Esto pudo deberse a diferentes factores del medio de cultivo, tanto en su composición, preparación o en su conservación. En estos casos, mediante metodología automatizada se determinó la identidad del microorganismo descartando a *C. dubliniensis*.

Con respecto al ATM, todas las colonias que viraron de color y de borde irregular con flecos (ver ANEXO figura 4) produjeron abundante cantidad de clamidoconidias en racimos al igual que en el agar semillas de girasol, corroborando que la modificación del medio por Khan permite evidenciar diferencias macro y microscópicas entre las colonias del Complejo *C. albicans* y de *C. dubliniensis*.

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, el algoritmo más adecuado que permitiría aumentar la probabilidad de diferenciar correctamente el Complejo *C. albicans* de *C. dubliniensis* es el uso conjunto de los medios ATM y ASG.

Además, el bajo costo en la preparación de estos medios y la sencillez en la observación microscópica permitirían su uso de rutina en los laboratorios de microbiología clínica.

En nuestro estudio, si bien la candidiasis vaginal por *C. dubliniensis* tiene baja prevalencia (0,96%), hay que tener en cuenta su presencia y buscarla debido al riesgo de candidiasis recurrentes por diagnóstico y tratamiento erróneo.

Bibliografía

1. Gómez, M., & Jewtuchowiz, V. (2017). Maestría en Micología Médica. Formación de biopelículas y su asociación con el uso de dispositivos intrauterinos (DIU). http://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/1539/RIUNNE_TM_Gómez_M.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2. Miró, M. S. (2017, 1 abril). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos | Revista Iberoamericana de Micología. *Iberoamericana de Micología*. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-candidiasis-vulvovaginal-una-antigua-enfermedad-S1130140617300281>
3. Pimentel Sarzuri, B., & Reynolds M., E. (2007). Candidiasis vaginal. Paceña de medicina familiar, 4(6), 121–127.
4. Pineda, G., Scollo, K., Santiso, G., Lehmann, E., & Arechavala, A. (2008). Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. Revista Argentina de Microbiología, 40(4), 211–217. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016788006>.
5. Bartoli, M. Z., Cingolani, B., García-Effron, G., & Gamarra, S. (2011). Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Propuesta de una secuencia de identificación. *Fabicib*, 15, 138–149. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v15i1.888>
6. Khan, Z. U. (2004). Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(10), 4796–4798. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4796-4798.2004>
7. Carballo, G., & Negroni, R. (2015). Identificación fenotípica de *Candida dubliniensis*, aisladas de candidiasis de mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/462>
8. Castro Mendez, C., & Martín Mazuelo, E. (2010). Diagnóstico de la infección fungicida por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. In Control Calidad SEIMC (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–10). <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Cdublinien.pdf>
9. Chowdhary, A., Randhawa, H. S., Kowshik, T., Kathuria, S., Roy, P., & Brandt, M. E. (2011). Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69, 440–442. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.012>

10. Ochoa, Y., Bedout, C., Arango, K., Retrepo, Á., & González, A. (2012). Determinación de las especies de *Candida* que colonizan el tracto respiratorio en pacientes sintomáticos respiratorios. *Hechos Microbiológicos*, 3(1), 10.
11. Papone, V. (2006). *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* patógenos orales oportunistas fenotípicamente y filogenéticamente relacionados. *Revista de La Facultad de Odontología de La Universidad Católica Del Uruguay.*, Vol III (N. 1), 36–41.

ANEXO

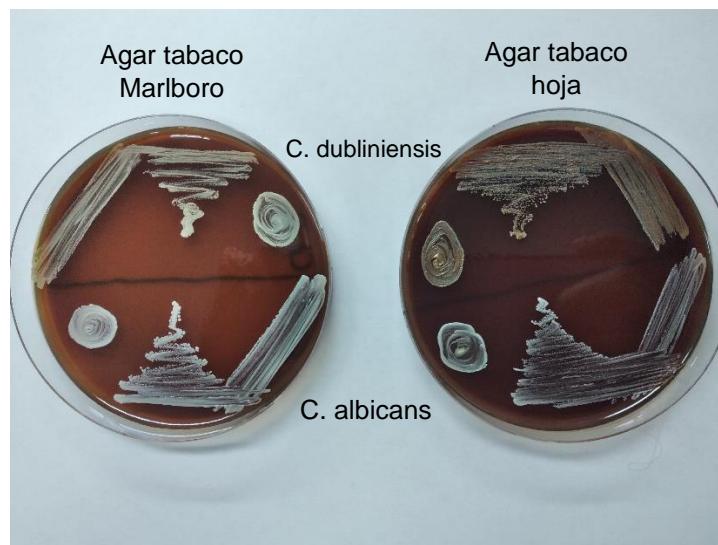


Figura 1. Comparación en color y aspecto de las cepas controles de *C. dubliniensis* (sembrada arriba) y Complejo *C. albicans* (sembrada abajo) en agar tabaco Marlboro y agar tabaco hoja.

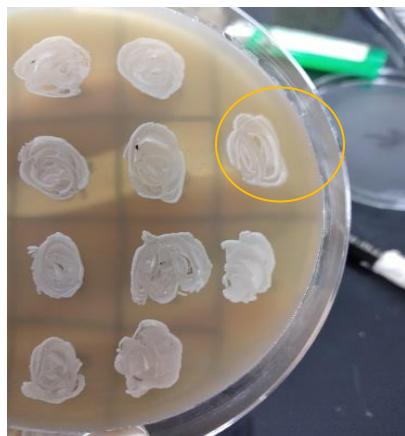


Figura 2. Colonia blanca y seca con flecos marcada con círculo correspondiente a *C. dubliniensis*. Medio agar semillas de girasol.



Figura 3. Colonia marrón seca con flecos marcada con círculo correspondiente a *C. dubliniensis*. Medio agar tabaco hoja.



Figura 4. Colonia marrón claro seca con flecos marcada con círculo correspondiente a *C. dubliniensis*. Medio agar tabaco Marlboro.

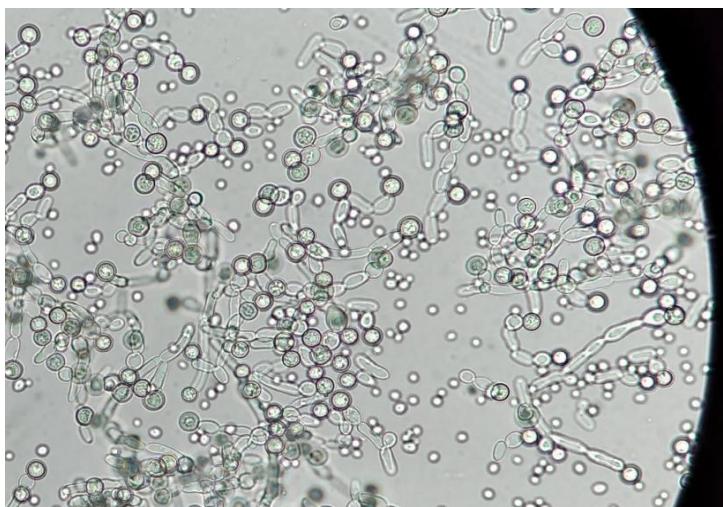


Figura 5. Clamidoconidias en racimos de *C. dubliniensis*, 400X.

Son células grandes, redondeadas, con pared engrosada y baja actividad metabólica, que se producen en el micelio de forma intercalar o terminal. Estas formas de resistencia, pueden dar lugar a nuevas levaduras o bien degenerar.

Las clamidoconidias se caracterizan por tener una capa externa compuesta principalmente por β -1,3 glucano y en menor proporción quitina, una gruesa capa interna compuesta por proteínas y una región central de la célula rica en ácido ribonucleico y glóbulos lipídicos.

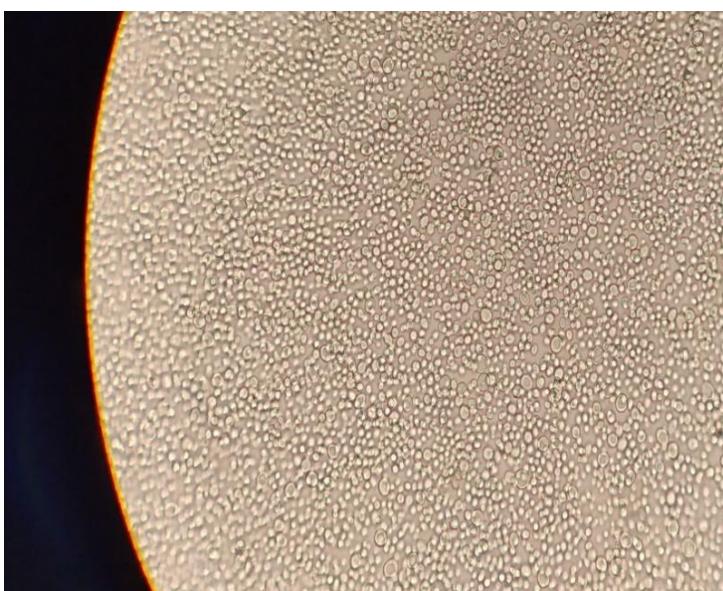


Figura 6. Complejo *C. albicans*, 400X.

Son células redondeadas producidas por gemación.



Figura 7. 400x. No se deben confundir estas estructuras con clamidoconidias.