

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Determinación de morfotipos de *Candida* spp en exudados vaginales

Lic. Mayda Perurena Lancha,¹ Dra. Mayda Rodríguez Soto,² Lic. Carlos Fernández Andreu,³ Dr. Gerardo Martínez Machín⁴ y Dra. Marina Flores Claro²

RESUMEN

Se tomaron muestras de exudados vaginales a 100 pacientes femeninas con sospechas de candidiasis vaginal que acudieron al Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Quirúrgico "Freyre de Andrade" de Ciudad de La Habana. Estas muestras se sembraron en agar Sabouraud y agar Sabouraud trifenil tetrazolio (AST). En 45 % de las muestras se obtuvo crecimiento de colonias levaduriformes, donde *Candida albicans* (51,1 %) y *C. glabrata* (22,2 %) fueron las especies aisladas con mayor frecuencia. Se logró demostrar que el AST permite diferenciar los morfotipos de las especies de levadura, y se observó que la mayoría de las especies presentó más de un morfotipo, predominando en *C. albicans* las colonias lisas, de color rosado claro sin halo micelial alrededor. En este no creció *C. glabrata*. Esta tipificación fenotípica en AST permitirá abordar estudios epidemiológicos en un futuro.

DeCS: CANDIDA ALBICANS/aislamiento & purificación; CANDIDIASIS VULVOVAGINAL/diagnóstico; MEDIOS DE CULTIVO.

La candidiasis vulvovaginal es causa común de morbilidad en mujeres y afecta alrededor de 75 % de todas las mujeres adultas, las que en algún momento de su vida padecen al menos de un episodio de esta infección.^{1,2} Esta micosis está asociada y favorecida por varios factores predisponentes como son el estrés, las enfermedades autoinmunes, la terapia con antibióticos, corticosteroides y drogas inmunosupresoras, el embarazo, el uso de anticonceptivos orales e intrauterinos, etc.^{3,4} El principal agente etiológico es *C. albicans*, aunque otras especies de *Candida* también pueden producir la enfermedad.⁵

En el presente trabajo sus autores se propusieron identificar las especies de las levaduras

aisladas de pacientes con flujo vaginal, mediante la utilización de 2 medios de cultivo y la determinación de sus morfotipos en el medio agar Sabouraud trifenil tetrazolio (AST).

Se tomó muestra de exudado vaginal con 2 hisopos estériles, a 100 pacientes femeninas que acudieron al laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Quirúrgico "Freyre de Andrade" de Ciudad de La Habana. La muestra se sembró simultáneamente en una placa de agar Sabouraud (AS) y otra de agar Sabouraud trifenil tetrazolio (AST), utilizando para cada medio un hisopo estéril y se incubaron a 37 °C por 48 h.⁶ Las placas que presentaban crecimiento característico de hongos levaduriformes se observaron al microscopio estereoscópico para distinguir la presencia de más

¹ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Especialista de I Grado en Microbiología. Hospital "Freyre de Andrade", La Habana.

³ Máster en Microbiología. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Agregado. IPK

⁵ Especialista de I Grado en Microbiología. Hospital "Freyre de Andrade", La Habana.

de un tipo de colonia; se tuvieron en cuenta sus características morfológicas macroscópicas como color, textura, etcétera.

A cada colonia morfológicamente distinta, se le realizó examen microscópico directo con agua destilada estéril para verificar la existencia de levaduras gemantes y luego se sembraron en placas de agar Sabouraud cloranfenicol (ASCL). Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h para obtener colonias aisladas. La identificación de las especies se realizó mediante la formación de tubos germinales, la filamentación en agar maíz y la asimilación de carbohidratos.⁷

Una vez identificadas las cepas, se procedió a su tipificación.⁶ Los cultivos de 48 h inoculados en AS se inocularon por estrías en placas de AST y fueron incubadas a 37 °C durante 6 d. Pasado este tiempo las cepas se codificaron según las características morfológicas de las colonias, basados en los aspectos siguientes:

Textura: lisa (L), rugosa (R).

Color: rosado (C), violeta (V), blanco (B), naranja (N).

Intensidad de color: claro (1), oscuro (2).

Presencia de halo micelial: sí existe (S), no existe (N).

El código NC fue usado cuando no se obtuvo crecimiento.

Se observó que en AS las colonias eran morfológicamente iguales, no ocurriendo así en el AST. Para el aislamiento primario de hongos y levaduras a partir de muestras clínicas, el medio de cultivo más utilizado es AS.⁸ Sin embargo, este tiene como inconveniente que no se puede hacer una buena diferenciación inicial de especies de levaduras, pues la morfología de las colonias de las diferentes especies de *Candida* generalmente es igual en este medio de cultivo. Esto demuestra que la selección de los medios de cultivo para el aislamiento primario de levaduras a partir de muestras clínicas, resulta de gran importancia.

En 45 % de las muestras se aisló algún tipo de levadura. En la tabla se muestran las especies encontradas en el flujo vaginal, donde *C. albicans* (51,1 %) y *C. glabrata* (22,2 %) fueron las más frecuentes; también se observa que la mayoría de las especies presentó más de un morfotipo,

predominando en *C. albicans* el LC1N. Se obtuvo un solo morfotipo (RA1N) de *Trichosporon beigeli*, y *C. glabrata* no creció en el medio AST.

TABLA. Especies y morfotipos de las levaduras aisladas en el flujo vaginal en el medio AST

Especies	Morfotipos	Número
<i>Candida albicans</i> (23) (51,1 %)	LC1N	9
	LC2N	5
	LC1S	3
	RC1N	2
	LC2S	2
	RC2N	1
	NC	1
<i>Candida glabrata</i> (10) (22,2 %)	NC	10
<i>Candida tropicalis</i> (5) (11,1 %)	LV2S	3
	NC	2
<i>Trichosporon beigeli</i> (3) (6,6 %)	RA1N	3
<i>Candida krusei</i> (2) (4,4 %)	LC1N	1
	LC2N	1
<i>Candida parapsilosis</i> (1) (2,2 %)	LV2N	1
<i>Candida pseudotropicalis</i> (1) (2,2 %)	NC	1

Nota: El significado de los códigos de los morfotipos aparece en métodos.

El medio AST puede ser utilizado en la tipificación de cepas dentro de una misma especie, pero no resulta útil para la identificación de especies, porque se puede observar la presencia de un mismo morfotipo en varias especies del género como los morfotipos LC1N y LC2N que aparecieron tanto en cepas de *C. albicans* como en cepas de *C. krusei*. En el transcurso de estos estudios de tipificación en este medio, se ha observado que pequeñas variaciones en la cuantía del inóculo, en la composición del medio y en la concentración del cloruro de tetrazolio, pueden provocar una notable diversificación del código de identificación, especialmente con respecto al color.⁹

La frecuencia con la cual se aíslan levaduras a partir de exudados vaginales ha promovido el interés de muchos investigadores para la identificación específica de estos agentes. *C. albicans* y *C. glabrata* son las especies de levaduras que producen vulvovaginitis con mayor frecuencia, lo cual coincide con los resultados de este trabajo.¹⁰⁻¹³

Algunos medios de cultivo se han creado sobre la base del color de las colonias, entre estos, el

AST, el cual además de ser un excelente medio para el aislamiento inicial de levaduras de muestras clínicas, permite detectar diferencias morfológicas, evidenciando la existencia de diversas especies de levaduras o de morfotipos de una misma especie. Esto se corresponde con lo reportado tanto en el ámbito nacional como internacional.^{12,14} Es importante señalar que en el presente estudio este medio no permitió el crecimiento de *C. glabrata* al igual que el realizado por *Quindos* y otros,⁶ por lo que de haber utilizado este medio solamente para el aislamiento inicial, no se habría obtenido ninguna cepa de *C. glabrata*, la cual se considera hoy día la segunda en orden de frecuencia de aislamiento, después de *C. albicans*.¹⁵

Se comprobó que el AST tiene muchas ventajas, porque es muy simple, es de bajo costo, no requiere de equipamiento adicional y resulta asequible a los laboratorios de pocos recursos; también es útil como método para la tipificación de las colonias de levaduras aisladas, pero no así para la identificación de las especies *Candida*, pues un mismo morfotipo puede estar presente en diferentes especies del mismo género.¹² Esto se confirma con los resultados del presente trabajo, donde aparecen 2 morfotipos tanto en cepas de *C. albicans* como de *C. krusei*.

Este trabajo permitió usar por primera vez el medio de AST para estudios de candidiasis vaginal en Cuba. La tipificación fenotípica en este medio permitirá abordar estudios clínicos y epidemiológicos en un futuro.

SUMMARY

Samples of vaginal smears were taken from 100 patients suspected of vaginal candidiasis that attended the Microbiology Laboratory of "Freyre de Andrade" Clinical and Surgical Hospital, in Havana City. These samples were cultivated in Sabouraud agar and Sabouraud triphenyltetrazolium agar (STA). In 45 % of the samples it was observed growth of the yeast-shaped colonies, where *Candida albicans* (51.1 %) and *C. glabrata* (22.2 %) were the most frequently isolated species. It was proved that STA allowed to differentiate the morphotypes of the yeast species and it was observed that most of the species presented more than one morphotype with the predominance of flat light pink

colonies without mycelial halo in *C. albicans*, *C. glabrata* did not grow in it. This phenotypic typing in STA will permit to approach epidemiological studies in a future.

Subject headings: CANDIDA ALBICANS/ isolation & purifications; CANDIDIASIS, VULVAGINAL/ diagnosis; CULTURE MEDIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fidel PL, Cutright JL, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2000;68:651-57.
2. Fidel PL. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 2002;40:359-75.
3. López Martínez R, Ruiz Sánchez J, Vértiz Chávez E. Vaginal candidiasis. *Mycopathologia* 1984;85:167-70.
4. Horowitz BJ, Giaquinta D, Ito S. Evolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: Implications for patient care. *J Clin Pharmacol* 1992;32(3):248-55.
5. Drutz DJ. *Lactobacillus* prophylaxis for *Candida* vaginitis. *Ann Intern Med* 1992;116(5):419-20.
6. Quindós G, Fernández M, Burgos A. Colony morphotype on Sabouraud Triphenyltetrazolium Agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2748-50.
7. McGinnis M. *Laboratory Handbook of Medical Microbiology*. New York:Academy Press INC; 1980: 337-40.
8. Haridy MSA, Moustafa A. Yeasts flora of the human vagina and effects of antifungal agents on its growth in vitro. *Kor J Mycol* 1993;21:140-5.
9. Andreoni S, Farina C, Masón A. *Candida albicans* subspecies identification on Sabouraud triphenyltetrazolium agar. *J Mycol Med* 1998;8:13-7.
10. Abu-Elteen KH, Abdul Malek AMM, Abdul Wahid NA. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast isolates in Jordan. *Mycoses* 1997;40:179-85.
11. Odds FC, Brawner DL. Typing of *Candida albicans* strains. *J Med Vet Mycol* 1992;30(1):87-94.
12. Martínez Machín G, Perurena Lancha M, Núñez Carvajal J, Fernández Andreu CM, Bandera Tirado JF. Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(3):174-80.
13. Samaranayake LP, MacFarlane TN. Comparison of Sabouraud Dextrosa and Pagano Levin agar media for detection and isolation of yeasts from oral samples. *J Clin Microbiol* 1987;25:162-4.
14. Higashide K, Aman R, Yamamuro O. Clinical characteristics correlated with different fungi causing vulvovaginal mycosis. *Mycoses* 1988;31(4):213-25.
15. Al-Hedaithy SSA, Fotedar R. Incidente of *Candida glabrata* in patient specimens. *Saudi J Biol Sci* 1999;6(1):76-81.

Recibido: 15 de enero de 2002. Aprobado: 3 de marzo de 2003. Lic. *Mayda Perurena Lancha*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu