

Determinación de las especies de *Candida* que colonizan el tracto respiratorio inferior en pacientes sintomáticos respiratorios

Identification of *Candida* species colonizing the lower respiratory tract in patients with respiratory symptoms

Yuliana Andrea Ochoa V.*, Catalina de Bedout†, Karen Arango-B.‡,
Ángela Restrepo†, Ángel González‡

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La sobrecolonización del tracto respiratorio inferior por levaduras del género *Candida* se considera una condición necesaria para el desarrollo de la infección candidiásica en pacientes con factores de riesgo.

OBJETIVO

Determinar las diferentes especies de *Candida* que colonizan el tracto respiratorio inferior en pacientes sintomáticos respiratorios, mediante el estudio del lavado broncoalveolar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, en el que se analizaron 61 muestras de lavados broncoalveolares (LBA) provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios. Las muestras se cultivaron en medios selectivos que incluyeron el CHROMagar *Candida*[™], agar tabaco y agar Sabouraud hipertónico; y se realizó identificación por medio de la técnica de asimilación de azúcares API 20C AUX[®]. Adicionalmente, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el fluconazol y voriconazol.

RESULTADOS

En 61 pacientes estudiados se observó que 26 de ellos (42.6%) estaban colonizados por una o más especies de *Candida* de acuerdo con la siguiente distribución: *C. albicans* (36.1%), *C. tropicalis* (8.2%), *C. krusei* (3.3%), *C. glabrata* (3.3%), *C. dubliniensis* (4.9%), *C. lusitanae* (1.6%) y otras especies de *Candida* (6.6%). Adicionalmente, se anotó que algunos de los pacientes estaban colonizados por más de una especie de *Candida*. *C. krusei* y *C. glabrata* presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a los azoles, mientras que *C. albicans* fue 100% sensible a estos antifúngicos.

CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la frecuencia de aislamientos de *Candida* spp., a partir de lavado broncoalveolar es mayor a lo reportado en otros estudios.

PALABRAS CLAVES

Candida spp., *C. albicans*, lavado broncoalveolar, tracto respiratorio.

*Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia; †Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); ‡Grupo de investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Contacto: angelgonzalezmarin1972@gmail.com
Recepción: 10-12-2012. Aceptación: 11-08-2012.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Colonization of the lower respiratory tract by *Candida* spp., is considered a prerequisite for the development of *Candida* infection in patients with risk factors.

OBJECTIVE

To determine the different *Candida* species colonizing the lower respiratory tract in patients with respiratory symptoms by bronchoalveolar lavages (BAL) assessment.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a descriptive study, which analyzed 61 BAL samples from patients with respiratory symptoms. BAL samples were cultured on selective media including CHROMagar *Candida*[™], tobacco agar and hypertonic Sabouraud agar; and identification was also performed by sugar assimilation method API 20C AUX[®]. Additionally, we determined the minimal inhibitory concentration (MIC) for fluconazole and voriconazole.

RESULTS

In 61 patients studied, we observed that 26 (42.6%) of them were colonized according to the following distribution: *C. albicans* (36.1%), *C. tropicalis* (8.2%), *C. krusei* (3.3%), *C. glabrata* (3.3%), *C. dubliniensis* (4.9%), *C. lusitanae* (1.6%) and other *Candida* species (6.6%). In addition, we found that some patients were colonized by more than one *Candida* species. *Candida krusei* and *C. glabrata* showed a diminished susceptibility or resistance to azoles, whereas *C. albicans* was 100% sensitive to these antifungals.

CONCLUSIONS

These results indicate that the frequency of the *Candida* spp., isolates in BAL from patients with respiratory symptoms is higher than that reported in other studies.

KEY WORDS

Candida spp., *C. albicans*, bronchoalveolar lavage, respiratory tract

INTRODUCCIÓN

El género *Candida* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, la que incluye alrededor de 200 especies y de éstas, aproximadamente 20 se han implicado en el desarrollo de enfermedades en el humano, algunas con más frecuencia que otras. La gran mayoría de las infecciones fúngicas son producidas por *C. albicans*; sin embargo, se ha venido observando un aumento de infecciones producidas por otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.¹⁻⁶ Por otro lado, los cambios observados en la epidemiología de las diferentes especies de *Candida*, están asociados con el aumento y aparición de resistencia a los antimicóticos, la cual parece estar distribuida de acuerdo con la localización geográfica.^{1,7} En algunos países, *Candida* spp., es el microorganismo causal más importante de micosis oportunistas en el medio intrahospitalario.⁸

Candida spp., coloniza con frecuencia la piel y las mucosas de los seres humanos y es considerada como parte de la microflora normal de la piel, mucosa oral, tracto genitourinario y tracto gastrointestinal,^{3,9} de tal forma que este microorganismo convive en equilibrio con las bacterias que hacen parte de la microflora normal. La enfermedad en el humano, asociada a este hongo oportunista, se origina cuando se rompe este equilibrio, ya sea por el uso de antibióticos de amplio espectro, procedimientos quirúrgicos, alteraciones de la fisiología del aparato digestivo o genitourinario (cirugía, nutrición parenteral, quimioterapia, etc.), así como también por factores predisponentes del paciente mismo,^{3,9} los que incluyen: prematuridad, bajo peso al nacer, estancia hospitalaria prolongada (especialmente en la unidad de cuidados intensivos [UCI]), neutropenias, uso de esteroides, nutrición parenteral e inmunodeficiencias. La sobrecolonización se ha destacado como uno de los eventos más importantes y también como una condición previa necesaria para el desarrollo de la enfermedad en pacientes con factores de riesgo.¹⁰⁻¹⁴ Por otro lado, los pacientes inmunosuprimidos y los críticamente enfermos presentan la mayor morbilidad y mortalidad, dado que en estas condiciones el incremento en el crecimiento de *Candida* spp., garantiza su capacidad de virulencia.^{9,11}

El significado del aislamiento de las diferentes especies de *Candida* a partir de esputos y lavados broncoalveolares (LBA) está ampliamente cuestionado

cuando se trata de considerar este microorganismo como agente causal directo de la enfermedad.^{2,14-17} La neumonía debido a *Candida* spp., es poco común; sin embargo, las levaduras de este hongo son frecuentemente aisladas en cultivos a partir de las secreciones respiratorias, las que a su vez, se encuentran colonizando el tracto orofaríngeo.^{2,5,16,18} Por lo tanto, la diferenciación entre colonización e infección es un punto clave a la hora de realizar el diagnóstico microbiológico de candidiasis a partir de las distintas muestras clínicas. Además, se recomienda que la terapia antifúngica contra *Candida* no debería ser iniciada solo con base en un cultivo positivo del tracto respiratorio, y en los casos en que *Candida* sea considerada como el posible agente causal de una neumonía, en la mayoría de los casos, es necesario, confirmar el diagnóstico mediante el empleo de estudios histopatológicos.^{2,16}

Es importante anotar la diferencia entre una infección de origen endógeno y una infección exógena, siendo la primera la responsable de la gran mayoría de las infecciones producidas por este microorganismo, las que a su vez, se relacionan con la pérdida del balance de la microflora normal o con la alteración de la respuesta inmune del hospedero.^{3,19-21} Generalmente, las fuentes de infección exógenas son las manos del personal médico o paramédico, los catéteres, válvulas cardíacas y respiradores, entre otros.^{21,20}

Por otro lado, se ha sugerido que un índice de colonización (IC) >0,5, definido como el número total de lugares anatómicos colonizados, dividido por el número total de muestras, podría ayudar a predecir el desarrollo de una candidiasis invasora.^{11,19} Además, el valor de un IC >2,5 se ha utilizado como herramienta para iniciar el tratamiento antifúngico preventivo en pacientes internados en las UCI, lo que permite una selección adecuada de los pacientes que deben recibir el tratamiento antifúngico como terapia profiláctica, y, al mismo tiempo, se previene el desarrollo de nuevas especies de *Candida* resistentes debido al uso inadecuado del tratamiento antimicótico.^{17,19} De igual manera, se sugiere el uso de antimicóticos diferentes al fluconazol en pacientes a quienes se les ha aislado *C. krusei* o *C. glabrata*, dado la resistencia que presentan estas especies.^{1,5,10,11,22}

A pesar que se ha reportado el aislamiento frecuente de *Candida* en muestras de LBA,¹⁷ aún no se han descrito cuales son las principales especies de *Candida* que colonizan el tracto respiratorio inferior,

lo que podría permitir identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar una infección.^{19,20} Además, es importante anotar que la terapia empírica inicial puede ser inadecuada para una especie con susceptibilidad disminuida a los antifúngicos convencionales.^{3,12}

En el presente estudio se determinaron las especies de *Candida* que colonizan el tracto respiratorio inferior de pacientes sintomáticos respiratorios, mediante el estudio del LBA, así como también, se asociaron estos hallazgos con el perfil de resistencia o susceptibilidad de estos microorganismos colonizantes a los agentes antifúngicos, principalmente fluconazol y voriconazol.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS CLÍNICAS Y CULTIVO

Se realizó un estudio descriptivo, en el que se analizaron 61 muestras de lavados broncoalveolares (LBA) provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios internados en diferentes hospitales de la ciudad de Medellín cuyas muestras fueron enviadas al laboratorio de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Todas las muestras fueron procesadas en cámara de bioseguridad debido a que procedían de pacientes sintomáticos respiratorios con sospecha de tuberculosis o de otras micosis. Tales muestras se depositaron en tubo falcon de 50 mL rotulado con el nombre y registro del paciente y, posteriormente, se centrifugaron por 30 minutos a 3.500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se sembró en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*[™] (CHROMagar, París, Francia). Las muestras se incubaron a 34°C durante 72 horas. Con este cultivo cromogénico se hizo una identificación presuntiva de las especies de *Cándida*, de acuerdo con las características colorimétricas indicadas por el fabricante. Después de la incubación se procedió a su interpretación según el color y el aspecto de la colonia, anotando que las colonias de color verde correspondían a *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Las levaduras que crecieron en estos medios fueron consideradas como colonizantes, es decir que no estaban asociadas con una patología evidente.² Posteriormente, se aisló una colonia de cada medio y se repicó en medio de Sabouraud sin antibióticos, y se incubó a 34°C durante 48 horas

para realizar las diferentes pruebas fenotípicas y de sensibilidad.

A las colonias de *Candida* que no fueron identificadas en el medio CHROMagar, se les realizó identificación por medio de la técnica de asimilación de azúcares API 20C AUX[®] (BioMérieux, Paris, Francia). Las demás levaduras que crecieron de color verde se cultivaron en medios tales como agar tabaco y Sabouraud hipertónico para la diferenciación presuntiva entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.²³⁻²⁵

AGAR TABACO

El método utilizado para la preparación del agar tabaco fue el descrito por Khan y Ahmad;²⁵ esta prueba presenta una sensibilidad de 80% y especificidad de 100% para la diferenciación fenotípica de estas dos especies.²⁶ En resumen, por cada 20 gr de tabaco se utilizaron 400 mL de agua destilada, la mezcla se hirvió durante 20 minutos y luego se filtró; posteriormente, se midió el pH del medio (pH 5,4) y se añadieron 4 gramos de agar. Finalmente se autoclavó a 121° durante 15 minutos.

Las colonias de color verde previamente aisladas en el CHROMagar, así como cepas control de referencia de *C. dubliniensis* y *C. albicans*, se subcultivaron en el agar tabaco y se incubaron a 34 °C por 48 horas para observar el aspecto y el color de la colonia. Posteriormente, se realizó observación microscópica para determinar la morfología y la presencia de clamidocidias.^{26,27}

AGAR SABOURAUD HIPERTÓNICO

Como se describió anteriormente, las colonias verdes que crecieron en el CHROMagar y las cepas control de referencia se cultivaron en agar sabouraud con 6,5% de NaCl. Este agar hipertónico se preparó utilizando 6,5 gr de agar Sabouraud y 6,5 gr de NaCl en 100 mL de agua destilada. Los aislamientos se incubaron a 34°C, y se realizó la lectura a las 48 horas. El crecimiento se calificó como positivo (+) o negativo (-).²³

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICÓTICOS

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada de acuerdo a lo descrito por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).^{28,29} Se utilizaron sensidiscos impregnados con fluconazol (FLU) 25 µg/mL y voriconazol (VOR) 1 µg/mL, los cuales se depositaron en agar Mueller Hinton suple-

mentado con glucosa y azul de metileno. El inóculo fue sembrado en tres direcciones a una escala de turbidez 0,5 de MacFarland y se incubó a 35°C por 24 horas. Después de la incubación se obtuvo un halo de inhibición y la lectura se realizó a través del Software comercial Biomic, un lector de cajas de petri con analizador digital de imágenes.¹ Para el FLU los aislamientos fueron considerados como susceptibles (S) con una CIM ≤8 µg/mL, sensibles dosis dependiente (SDD) con una CIM entre 16 y 32 µg/mL o resistente (R) con un valor de la CIM ≥64 µg/mL); para VOR los aislamientos fueron considerados como S con valores de la CIM ≤1 µg/mL, SDD con valores de la CIM entre 2 y 4 µg/mL, o R con valores de la CIM ≥4 µg/mL.

RESULTADOS

De un total de 61 muestras de LBA evaluadas provenientes de igual número de pacientes sintomáticos respiratorios, 26 (42,6%) fueron positivas para una o más especies de *Candida*. De los 26 pacientes, 3 fueron colonizados por 3 especies (11,5%), 8 fueron colonizados por 2 especies (30,8%), y 15 pacientes fueron colonizados por una sola especie (57,7%).

La principal especie aislada fue *C. albicans* presente en 22 pacientes (36,1%), seguida por *C. tropicalis* aislada de 5 pacientes (8,2%), *C. krusei* aislada de 2 pacientes (3,3%), *C. glabrata* aislada de 2 pacientes (3,3%), *C. dubliniensis* aislada de 3 pacientes con identificación presuntiva por los métodos fenotípicos (4,9%), y *C. lusitanae* aislada de 1 paciente (1,6%); además se obtuvieron 4 (6,5%) aislamientos correspondientes a otras especies de *Candida* que no pudieron ser identificadas claramente por los métodos utilizados (figura 1). En general, las especies no *albicans* se aislaron conjuntamente con *C. albicans*, a excepción de la muestra de un paciente, que solo mostró colonización por *C. krusei*.

Adicionalmente, a las colonias de *Candida* que produjeron color verde en CHROMagar y que fueran identificadas como *C. albicans*, se les realizó cultivo en agar Sabouraud hipertónico y agar tabaco para diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. El color de las colonias de *C. albicans* presentó variaciones, 5 de los 25 aislamientos eran de color verde oscuro (20%) y las 20 restantes eran de color verde claro (80%); sin embargo, esta variación no fue criterio para diferenciar estas especies.²⁷ A nivel macroscópico en el agar

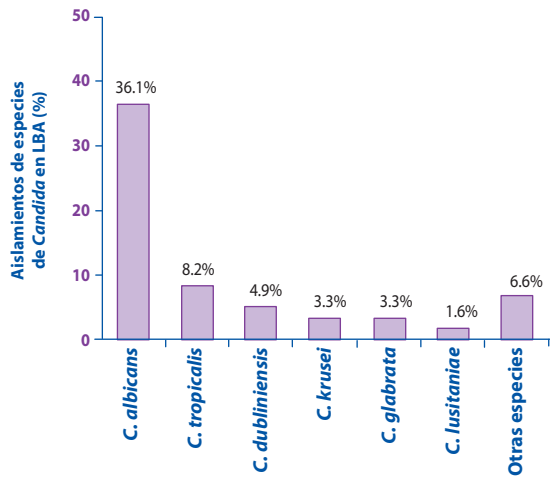


Figura 1. Frecuencia de las especies de *Candida* aisladas en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios.

tabaco, las colonias de *Candida*, incluyendo las de una cepa de referencia de *C. albicans*, presentaron un aspecto de color blanco y fueron lisas. En el caso de las cepas de referencia de *C. dubliniensis*, una cepa fue de color blanco y otra de color beige, ambas con una apariencia lisa, características que no concuerdan con las descritas en estudios anteriores, donde *C. dubliniensis* se observa de color amarillo y con apariencia rugosa,²⁵⁻²⁷ sin embargo, a nivel microscópico se observó la producción de clamidoconidias características en los aislamientos cultivados en agar tabaco. En 3 aislamientos de pacientes sintomáticos respiratorios y en la cepa control de *C. dubliniensis*, se observó la producción de clamidoconidias (figura 2A). Por otro lado, se observó que la cepa control de *C. albicans* y todos los aislamientos de los pacientes, a excepción de uno (el que no produjo clamidoconidias en el agar tabaco), crecieron en el agar hipertónico (figura 2B). Las dos cepas de referencia de *C. dubliniensis* no crecieron en el agar hipertónico. Veintidós de los 25 aislamientos de

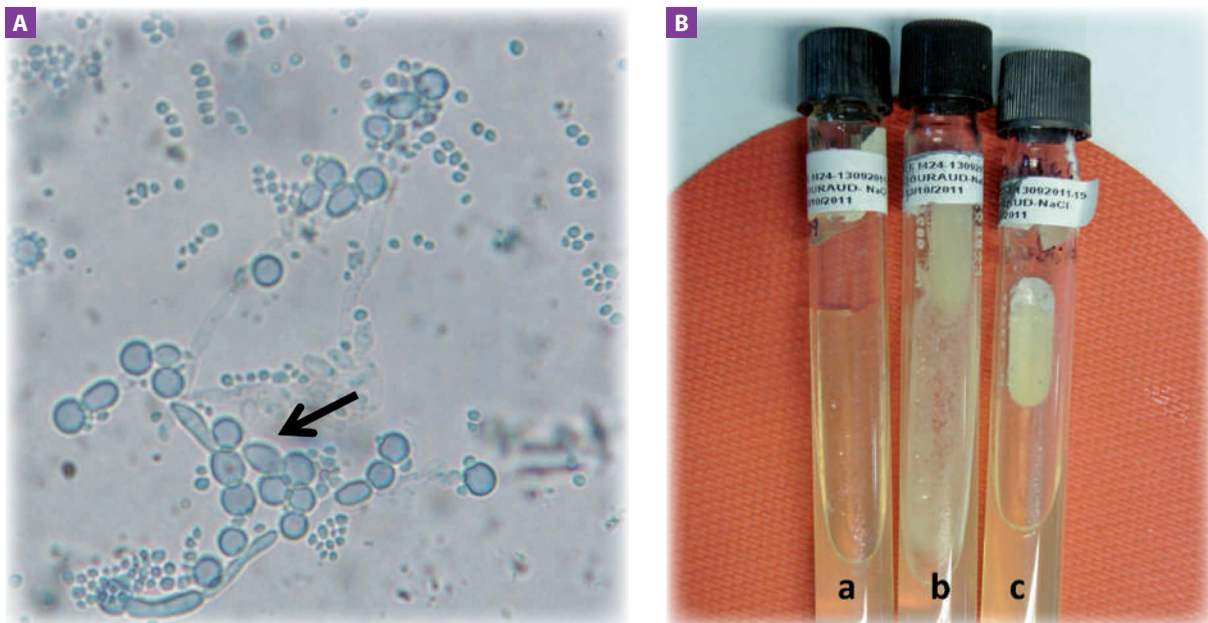


Figura 2. Características micro y macroscópicas de aislamientos de *Candida* spp., cultivados en agar tabaco y agar Sabouraud hipertónico. **A.** Observación microscópica de clamidoconidias en agar tabaco (40X). **B.** Crecimiento de *Candida* spp., en agar Sabouraud hipertónico (6,5% de NaCl): a) cultivo negativo utilizando un aislamiento control de *C. dubliniensis*; b) cultivo positivo utilizando un aislamiento control de *C. albicans*; y c) cultivo negativo de *Candida* spp., aislado previamente del LBA de un paciente.

Candida presentaron todas las características fenotípicas compatibles con las descritas para *C. albicans* en el agar tabaco y el agar hipertónico a excepción de tres colonias, una de las cuales coincidía fenotípicamente en todos los medios utilizados con *C. dubliniensis*,²³⁻²⁶ y dos que en el agar tabaco presentaron producción de clamidoconidias (tabla 1).

En la tabla 2 se describen los valores de las CIM de las diferentes especies de *Candida* evaluadas en el presente estudio. Se observó que el 100% de los aislamientos de *C. albicans*, el aislamiento de *C. lusitanae* y los 3 aislamientos compatibles con *C. dubliniensis* fueron sensibles (S) al FLU y VOR, mientras que de los 5 aislamientos de *C. tropicalis* 3 (60%) fueron S, 1 (20%) SDD y 1 (20%) R al FLU; en cuanto al VOR, 4 (80%) de los aislamientos de *C. tropicalis* fueron S y 1 (20%) R. Para *C. glabrata* se observó que 1 de los 2 aislamientos fue SDD y el otro S al FLU y los dos aislamientos S al VOR. Los dos aislamientos de *C. krusei* fueron R al FLU, uno SDD y el otro S al VOR. En general, se observó que el VOR fue más activo que el FLU contra la mayoría de las especies.

De los 26 pacientes colonizados por las diferentes especies de *Candida*, solo se tuvo acceso a 11 historias clínicas. Las características clínicas de estos pacientes, así como la o las especies de *Candida* aisladas y el perfil de susceptibilidad se describen en la tabla 3. Se observó que 8 pacientes estaban hospitalizados y los otros 3 que eran sintomáticos respiratorios que consultaban a nivel ambulatorio. De los 8 pacientes hospitalizados, 5 estaban colonizados por una especie de *Candida* y 3

por dos especies de *Candida*, 6 eran VIH positivos, 3 tenían TB, 1 tenía ventilación mecánica y 2 estaban recibiendo tratamiento con antimicóticos, uno de ellos con un aislamiento con identificación presuntiva para *C. dubliniensis* y *C. glabrata* siendo esta última SDD para FLU. El otro paciente en tratamiento con antimicóticos presentó colonización por *C. albicans* y *C. tropicalis*, y esta última presentó resistencia a ambos azoles. Los 3 pacientes ambulatorios estaban colonizados por 1, 2 y 3 especies de *Candida*, respectivamente, todas ellas sensibles al FLU y VOR (tabla 3).

DISCUSIÓN

El tracto respiratorio está frecuentemente colonizado por diferentes especies de *Candida*, especialmente en aquellos pacientes que reciben o han recibido asistencia respiratoria y aquellos que se encuentran hospitalizados, especialmente en las UCI.^{5,18,28} Por lo tanto, el aislamiento de *Candida* en LBA indican colonización,^{17,19} y no necesariamente evidencian una candidiasis pulmonar invasora (verdadera neumonía por *Candida*).

En el presente estudio se describen por primera vez las especies de *Candida* aisladas en muestras de LBA provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios en Colombia. Los resultados muestran un mayor número de aislamientos (42,6%) para *Candida* spp., en muestras de LBA, en comparación con otros reportes en la literatura en donde esta levadura fue aislada solo en el 8% de las muestras.¹⁷

Tabla 1. Características fenotípicas de *C. dubliniensis* aisladas en CHROMagar. Identificación macro y microscópica en agar Sabouroud hipertónico (NaCl al 6.5%) y en agar tabaco.

| Identificación presuntiva de <i>C. dubliniensis</i> | Crecimiento en NaCl (6.5%) | Producción de clamidoconidias en agar tabaco | Macroscopía en agar tabaco |
|---|----------------------------|--|----------------------------|
| Aislamiento #1. | + | + | Blanca, lisa. |
| Aislamiento #2. | + | + | Blanca, lisa. |
| Aislamiento #3. | - | + | Blanca, lisa. |
| Control <i>C. albicans</i> ATCC 90028. | + | - | Blanca, lisa. |
| Control #1 <i>C. dubliniensis</i> . | - | + | Blanca, lisa. |
| Control #2 <i>C. dubliniensis</i> . | - | + | Beige, lisa. |

Positivo (+), negativo (-).

Tabla 2. Valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) al fluconazol (FLU) y voriconazol (VOR) en las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes sintomáticos respiratorios e identificadas por métodos fenotípicos.

| Especie | # de aislamientos | FLU $\mu\text{g/mL}$ | VOR $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| <i>C. albicans</i> | 7 | $\leq 0,25$ | $\leq 0,01$ |
| | 4 | 0,41 | $\leq 0,01$ |
| | 2 | 1,1 | 0,03 |
| | 1 | 1,1 | 0,04 |
| | 1 | 2,4 | 0,08 |
| | 1 | 2,4 | 0,1 |
| | 1 | 1,8 | 0,04 |
| | 2 | 0,87 | 0,03 |
| | 1 | 1,4 | 0,06 |
| | 1 | 1,8 | 0,05 |
| | 1 | 1,8 | 0,06 |
| | 1 | 0,68 | 0,03 |
| <i>C. tropicalis</i> | 1 | 1,4 | 0,04 |
| | 1 | ≥ 165 | $> 6,1$ |
| | 1 | 17 | 0,94 |
| | 1 | 3,9 | 0,41 |
| | 1 | 0,87 | 0,15 |
| <i>C. glabrata</i> | 1 | 17 | 0,22 |
| | 1 | 1,1 | 0,33 |
| <i>C. krusei</i> | 1 | ≥ 165 | 2,2 |
| | 1 | ≥ 165 | 0,62 |
| <i>C. lusitaniae</i> | 1 | 8,2 | 0,33 |
| <i>C. dubliniensis</i> | 2 | $\leq 0,25$ | $\leq 0,01$ |
| | 1 | 0,32 | $\leq 0,01$ |

Estudios previos han encontrado una asociación entre *Candida* y *Pseudomona*, donde la colonización por la primera en tracto respiratorio, incrementa el riesgo de infección por *Pseudomona*.^{18,28} De interés, en nuestro estudio observamos que muchos de los pacientes colonizados por *Candida* spp., estaban infectados con el VIH y algunos de ellos tenían TB. Lo anterior podría sugerir que estos pacientes estarían en un posible riesgo de exacerbación no solo de otras infecciones concomitantes, sino también al desarrollo de una infección por la *Candida* colonizante.

Adicionalmente, se ha encontrado que aquellos pacientes sometidos a ventilación mecánica,³⁰ el tubo endotraqueal puede servir como un conducto para que *Candida* spp., colonice las vías respiratorias inferiores.¹⁸ En el presente reporte observamos que un paciente hospitalizado expuesto a ventilación mecánica, estaba colonizado por *C. dubliniensis*.

En nuestro medio, los datos sobre la incidencia de infecciones por *C. dubliniensis* son todavía escasos, dado que esta especie no puede diferenciarse de *C. albicans* por métodos convencionales para la identificación de esta levadura.²⁶ Adicionalmente, se ha reportado un aumento de aislamientos de *C. dubliniensis* resistentes al fluconazol, por lo que se hace necesario e imperativo diferenciar estas dos especies.^{24,26} *C. dubliniensis* coloniza la mucosa oral de pacientes infectados por el VIH,^{23,24,26} pero no se ha descrito que esta especie colonice el tracto respiratorio inferior. En el presente estudio, observamos que al utilizar medios fenotípicos selectivos como el agar tabaco y el agar hipertónico para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* se obtuvieron 3 aislamientos presuntivos de *C. dubliniensis* en pacientes VIH positivos. Sin embargo, sería necesario confirmar la especie de estos aislamientos por medio de pruebas moleculares.²⁶ Se anota que la formación de clamidoconidias en agar tabaco fue más sensible y específico que otros medios utilizados regularmente.²⁶ Este estudio demuestra la posibilidad de *C. dubliniensis* como un posible agente colonizador del tracto respiratorio inferior en pacientes VIH positivos.

A la fecha, la colonización de las vías respiratorias por *Candida* spp., no requiere tratamiento antifúngico profiláctico. Además, otros estudios han reportado que la colonización de las vías respiratorias por este microorganismo se asocia con su presencia en múltiples sitios extrapulmonares; sin embargo, bajo ciertas circunstancias, tales como inmunosupresión severa

Tabla 3. Características clínicas de pacientes colonizados por diferentes especies de *Candida*, y perfil de susceptibilidad de los aislamientos al fluconazol y voriconazol.

| Paciente | Procedencia | Características clínicas | Especie de <i>Candida</i> aislada | CMI al FLU µg/mL | CMI al VOR µg/mL |
|----------|----------------|--|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | Hospitalizado. | TBC pleuropulmonar, tratamiento con antimicóticos. | <i>C. albicans.</i> | 0,41 | ≤ 0,01 |
| | | | <i>C. tropicalis.</i> | ≥165 | >6,1 |
| 2 | Hospitalizado. | Endobronquitis, VIH+, tratamiento con fluconazol. | <i>C. dubliniensis.</i> | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| | | | <i>C. glabrata.</i> | 17 | 0,22 |
| 3 | Hospitalizado. | Neumonía, VIH+. | <i>C. albicans.</i> | 1,8 | 0,04 |
| 4 | Hospitalizado. | VIH+, ventilación mecánica. | <i>C. dubliniensis.</i> | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| 5 | Hospitalizado. | VIH+, infiltrado pulmonar. | <i>C. albicans.</i> | 0,41 | ≤ 0,01 |
| 6 | Hospitalizado. | VIH+, Insuficiencia respiratoria aguda. | <i>C. albicans.</i> | 0,32 | ≤ 0,01 |
| 7 | Hospitalizado. | Tratamiento TBC. | <i>C. albicans.</i> | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| | | | <i>C. krusei.</i> | ≤ 165 | 2,2 |
| 8 | Hospitalizado. | VIH+, meningitis TBC. | <i>C. albicans.</i> | 0,65 | 0,03 |
| 9 | Ambulatorio. | Infiltrado micronodular bilateral. | <i>C. albicans.</i> | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| 10 | Ambulatorio. | CA esofágico. | <i>C. lusitaniae.</i> | 8,2 | 0,33 |
| | | | <i>C. tropicalis.</i> | 3,9 | 0,41 |
| | | | <i>C. albicans.</i> | 1,1 | 0,04 |
| 11 | Ambulatorio. | TBC resistente. | <i>C. albicans.</i> | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| | | | <i>C. tropicalis.</i> | 1,4 | 0,04 |

TBC: tuberculosis. **CA:** cáncer. **VIH:** virus de inmunodeficiencia humana. **CIM:** concentración inhibitoria mínima. **FLU:** fluconazol. **VOR:** voriconazol.

o uso de fármacos con efecto inmunosupresor en pacientes colonizados por este agente fúngico, se recomienda el inicio de un tratamiento profiláctico.^{19,28} Nuestros resultados coinciden con estudios anteriores donde se ha observado que en pacientes que reciben terapia antifúngica para infecciones por *Candida* en sitios diferentes al tracto respiratorio, es posible aislar *Candida* en muestras de LBA.¹⁷ Sin embargo, en tales estudios no se ha determinado la sensibilidad a estos dos antimicóticos. En el presente reporte, se determinó el perfil de susceptibilidad de todos los aislamientos de *Candida* spp., encontrados en los pacientes evaluados. En las pruebas de sensibilidad, nuestros resultados coinciden con reportes previos,^{1,5,11,22,10}

donde *C. krusei* y *C. glabrata* presentan resistencia o sensibilidad disminuida a los azoles, mientras *C. albicans* muestra un 100% de sensibilidad frente a estos agentes antimicóticos.^{1,29}

No obstante, nuestro estudio presenta varias limitaciones, entre ellas la posibilidad de que las muestras de LBA, representativas del tracto respiratorio inferior, podrían contaminarse con la microflora oral y orofaríngea durante el proceso de la toma de la muestra. Otra limitación es no tener todos los datos clínicos de los pacientes que permitan hacer una correlación de su estado clínico y de las especies de *Candida* aisladas, así como no contar con pruebas moleculares disponibles en los laboratorios de diagnóstico que

permitan confirmar las especies de *Candida* que han sido aisladas. Los métodos moleculares son el medio más fiable para la identificación de las diferentes especies de *Candida*; sin embargo, aquellos laboratorios que no cuentan con estos medios, pueden utilizar métodos fenotípicos y de asimilación de hidratos de carbono (API) para la identificación presuntiva de las distintas especies. Adicionalmente, el uso de medios cromogénicos en los laboratorios para el aislamiento e identificación presuntiva de importantes especies (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*) son fáciles de realizar, requieren menos tiempo y son razonables en aquellos casos en los que se debe iniciar tratamiento rápidamente.³¹

Los resultados del presente trabajo indican que aproximadamente el 42% de los pacientes sintomáticos respiratorios podrían estar colonizados por diferentes especies de *Candida*. De interés, los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos se comportaron de forma similar a lo reportado previamente, siendo *C. albicans* la especie más comúnmente aislada y susceptible a los azoles más utilizados; *C. dubliniensis* presentó buena sensibilidad frente a estos azoles, mientras que los aislamientos de *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (al menos un aislamiento por especie) fueron resistentes al FLU. Finalmente, se recomienda el uso de nuevos métodos diagnósticos, así como la implementación de ensayos de susceptibilidad como pruebas regulares para aislamientos de muestras de LBA, especialmente en pacientes que se encuentran en las UCI o que tienen una enfermedad de base, como lo son aquellas que comprometen el estado inmune del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a todos los integrantes del grupo de Micología Médica y Experimental de la CIB que colaboraron en el desarrollo de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existen conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al.** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:1735-45.
2. **Barenfanger J, Arakere P, Cruz RD, Imran A, Drake C, Lawhorn J, Verhulst SJ, Khardori N.** Improved outcomes associated with limiting identification of *Candida* spp., in respiratory secretions. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5645-9.
3. **Concia E, Azzini AM, Conti M.** Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs.* 2009; 69 Suppl 1: 5-14.
4. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* 2010; 36:1-53.
5. **Hazen KC, Howell SA.** *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry MI, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical Microbiology*, 9th ed. Washington, DC: ASM press; 2007. p. 1762-88.
6. **Zuluaga-Rodriguez A, de Bedout-Gomez C, Agudelo-Restrepo CA, Hurtado-Parra H, Arango-Arteaga M, Restrepo-Moreno A, et al.** Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27:125-9.
7. **Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, et al.** Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009; 37:1612-18.
8. **Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, et al.** Guidelines for the treatment of Invasive Candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29:345-61.
9. **Cortés J.** Epidemiología de *Candida* spp., en Colombia y su susceptibilidad en mujeres. *Infectio* 2009; 13: 3-5.
10. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:133-63.
11. **Charles PE.** Multifocal *Candida* species colonization as a trigger for early antifungal therapy in critically ill patients: what about other risk factors for fungal infection? *Crit Care Med.* 2006; 34:913-4.

12. **Mean M, Marchetti O, Calandra T.** Bench-to—bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care*. 2008; 12:204. doi:10.1186/cc6212
13. **Farmaki E, Eudoridou J, Poulidou T, Bibashi E, Panagopoulou P, Filloti J, et al.** Fungal colonization in the neonatal intensive care unit: risk factors, drug susceptibility and association with invasive fungal. *Infections*. *Am J perinatal*. 2007; 24: 127-35.
14. **Eggiman P, Garbino J, Pitet D.** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:685-702.
15. **Delisle MS, Williamson DR, Perreault MM, Albert M, Jiang X, Heyland DK.** The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. *J Crit Care*. 2008; 23: 11-7.
16. **Papas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious Diseases Society of America. *Clin Inf Dis*. 2009; 48:503-35.
17. **Wood G, Mueller E, Croce M, Boucher B.** *Candida* spp. isolated from bronchoalveolar lavage: clinical significance in critically ill trauma patients. *Intensive Care Med*. 2006; 32:599-603.
18. **Heo S, Sung RS, Scannapieco F, Haase E.** Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *J Oral Microbiol*. 2011; 3: 6362. doi: 10.3402/jom.v3i0.6362.
19. **León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, et al.** A bedside scoring system ("*Candida* score") for early antifungal treatment in non neutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*, 2006; 34: 730-7.
20. **de Bedout C, Gómez B.** *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio*. 2010; 14: 31-43.
21. **Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ.** *Candida*. En: Anaissie EJ, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*, 2nd ed. Oxford, UK: Elsevier; 2009. p. 197-229.
22. **Agvald-Ohman C, Klingspor L, Hjelmqvist H, Edlund C.** Invasive candidiasis in long-term patients at a multidisciplinary intensive care unit: *candida* colonization index, risk factors, treatment and outcome. *Scand J Infect Dis*. 2008; 40:145-53.
23. **Chowdhary A, Randhawa H, Kowshik, Kathuria S, Roy P, Brandt ME.** Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diag Microbio Inf Dis*. 2011; 69: 440-2.
24. **Akgül O, Cerikçioğlu N.** Hypertonic sabouraud dextrose agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*. *Mycopathologia* 2009; 167: 357-359.
25. **Khan Z, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R.** Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4796-8.
26. **Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Cordoba S, Isla MG, Murisengo OA, Szusz W, et al.** Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia in Argentina: Identification by a Novel Multiplex PCR and Comparison of Different Phenotypic Methods. *Mycopathologia*. 2011; 172:407-14.
27. **Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Archavala A.** Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos: Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev Argent Microbiol*. 2008; 40: 211-7.
28. **Azoulay E, Timsit J, Tafflet M, de Lassence A, Darmon M, Zahar JR, et al.** *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent Pseudomonas ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2006; 129:110-7.
29. **Tapia PC.** Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect*. 2009; 26: 144-50.
30. **Williamson D, Albert M, Perreault M, Delisle M, Muscedere J, Rotstein C, et al.** The relationship between *Candida* species cultured from the respiratory tract and systemic inflammation in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Can Anaesth*. 2011; 58: 275-84.
31. **Nadeem S, Hakim S, Kazmi S.** Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource - limited settings. *Libyan J Med*. 2010, 5: 2144. doi: 10.3402/ljm.v5i0.2144.