

Investigación de *Candida Albicans* en estudiantes de odontología.

Pignolo M. P.*, Adalid C. G.**, Mancho Martín G.*, Hermida Lucena P.***

* Prof. Ad. Cátedra de Microbiología FOR UNR

** JTP Cátedra de química FOR UNR

*** Prof. Titular Cátedra de Microbiología FOR Investigadora CIC UNR

RESUMEN Para contribuir a conocer *C albicans* en estudiantes de odontología y la utilidad *Candid ID Bio Merieux®* se estudiaron 132 muestras de saliva de estudiantes. Se cultivaron en (*SbGCI*) *Britania®* pH 5.6 con incubación 28° C y 36° C previo tratamiento con ácido cítrico 10% / 24hs y en *Candid ID* a 37° C con lectura a las 24 y 48 hs. Resultados: A) De las 132 muestras cultivadas en *SbGCI* 66 desarrollaron tubo germinativo. B) Con *Candid ID* se realizaron 71 aislamientos, en 66 de ellos hubo desarrollo de colonias azul celeste compatible con *C. albicans*, 2 rosa pálido y 1 rosa intenso ambas compatibles con *Candida tropicalis*, *Candida lusitniae*, *Candida gililermundii* y *Candida keyfr* y 2 blanco cremoso compatibles con otras levaduras. Conclusiones: Se aisló levaduras en más de la mitad de las muestras de saliva por ambos métodos, (*Candid ID* 53,8% y *SbGC* 52,3%) del grupo estudiado. Comparando los 69 aislamientos de levaduras en medio (*SbGCI*) y las 71 obtenidos por cultivo directo en *Candid ID* se comprueba que hay una diferencia en solo 2 aislamientos (1,5%). *Candid ID* es sencillo, práctico, específico y rápido de leer, donde se necesita un diagnóstico rápido.

Palabras clave

C. albicans - *Candid ID* – Tubo germinativo.

SUMMARY In the aim to know *C albicans* epidemiology and the possible uses of *Candid ID Bio Merieux®* 132 salivary samples of Odontology students were studied. All of them were treated with citric acid, cultivated in *SbGCI Britania®* pH 5.6 and incubated at 28° C and 36° C and also were cultivated in *Candid ID* at 37° C, reading at 24 and 48 hs. Mycology results: A) 66 out of 132 samples cultivated in *SbGCI* developed germ tube. B) 71 samples were positive with *Candid ID*, 66 of them with strains sky blue colour, like *Candida albicans*; 2 strains pink and 1 strain intense pink like *Candida tropicalis*, *Candida lusitniae* or *Candida gililermundii* and *Candida keyfr* and 2 strains creamy white compatible with others strains.

Conclusions: In this study, yeast were isolated in more than a half of salivary samples in both methods (*Candida ID*: 58,8% and *SbGCI*: 53,2%) and only two differences (1,5%) were found when these two methods were compared (71 isolation in *Candida ID* and 69 in *SbGCI*). It has been concluded from this study that *Candida ID* is quick, practical and specific whenever presumptive diagnosis is required.

Key words

C. albicans – *Candid ID* – Germ tube

Introducción

Candidiasis es una infección generalmente endógena que compromete piel, faneras, mucosas o puede diseminarse y tornarse sistémica produciendo endocarditis, sepsis, meningitis.

Es causada por varias especies del género *Candida*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea*, pero la más frecuente es *Candida albicans* que es biota habitual del tracto gastrointestinal.

Es una levadura Gram positiva alargada, aerobia, capaz de desarrollar pseudo filamentos, producir clamidosporas, hifas verdaderas y pseudohifas, estas se forman a partir de brotes que se alargan, continúan conectadas, siendo más anchas que las hifas verdaderas y con constricciones en los sitios de unión. Su diámetro varía entre 3-6 μ , es de forma oval y paredes delgadas. Por microscopía óptica se observa con brotes de células hijas y cortas pseudohifas, a veces se ven largas formas con grupos celulares, blastosporas, en las constricciones. Las hifas sólo se producen en el momento de la invasión a los tejidos, existiendo nume-

Resultado del cultivo en SbGCI		
Cultivos	Nº de muestras	%
<i>Positivos</i>	86	65,15%
<i>Negativos</i>	46	34,85%
<i>Total</i>	132	100%

Tabla 1

rosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean su desarrollo *in vitro*, se desconoce la regulación de la morfogénesis de *C. albicans*.

Primera etapa para que se produzca la infección:

La adherencia de *C. albicans* es el primer paso en la colonización e invasión de los tejidos mucocutáneos.

Esta adhesión, probablemente esté mediada por la interacción de glucoproteínas de superficie de *Candida* spp con la célula epitelial o mucosa del hospedador, las especies de *Candida* spp que no se adhieren son no patógenas.¹

Segunda etapa:

Aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio, según la especie, que por intermedio de ellos penetran directamente en la célula epitelial o mucosa.

Tercera etapa:

La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrofílicas como proteinasas, fosfatasas, y fosfolipasas.

Cuarta etapa:

Penetración intracelular y proliferación: Una vez dentro de la célula epitelial los hongos proliferan.

Resultado de cultivos positivos en SbGCI	
Aislamientos	Nº de Muestras
<i>Levaduras</i>	64
<i>Cultivos mixtos (levaduras+bacteria)</i>	5
<i>Bacterias</i>	17
<i>Total</i>	86

Tabla 2

Su actividad está condicionada por la respuesta moduladora del sistema inmune y de adherencia al tejido del hospedador. *Candida* spp presenta el gen de la hexosaminidasa (HEX1), genes de proteinasas aspárticas (SAP 1, SAP 2, SAP 3 Y SAP 4) y el gen del tubo germinativo que

incrementa la adhesión (INT 1). Un estímulo incuestionable es el suero humano ya que incubada una muestra de *C. albicans* 60 minutos a 37° C, comienza a formar hifas; esta reacción se manifiesta por la aparición de un tubo germinal^{2,3}, que se observa como un largo apéndice que crece hacia afuera y que tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la levadura. En *C. albicans* el tubo germinal es un tubo sin constricción en el punto de origen mientras que en *C. tropicalis* presenta una constricción característica.

Para obtener energía fermenta sacarosa, glucosa y maltosa, pero no lactosa, produciendo ácido y gas, en especial a partir de sacarosa. Esta fermentación de carbohidratos junto a las características morfológicas distinguen a *C. albicans* de las otras especies de *Candida*. Hay varios componentes en el sistema de defensa del huésped para proteger contra una infección por *C. albicans*. Una barrera tegumentaria intacta, que comprende piel y mucosas, evita la infección de microorganismos que normalmente forman colonias y que poseen propiedades de adherencia que aún son motivo de estudio. El hombre es el reservorio a nivel mundial y si bien no es transmisible de un paciente a otro, se han comunicado casos de transmisión por contacto sexual, a través de las manos de personal de salud y durante el nacimiento donde la infección va desde la vagina materna a orofaringe del recién nacido. Por lo general viven en equilibrio con otros microorganismos existiendo como comensal saprofito.⁴

Aislamientos de levaduras por candida ID		
<i>Resultados</i>	<i>Muestras</i>	<i>%</i>
<i>Positivos</i>	71	54,6%
<i>Negativos</i>	61	45,4%
<i>Total</i>	132	100%

Tabla 3

La infección por *C. albicans* en cavidad bucal rara vez se extiende hacia la faringe y esófago, en algunos casos evoluciona hacia una candidiasis mucocutánea crónica. Se manifiesta en todas las edades, razas y sexos, habiéndose reconocido causas predisponentes⁵. El muguet se observa con frecuencia en lactantes cuyas madres padecen de candidiasis vaginal y en enfermos ancianos con enfermedades consuntivas como tuberculosis y cáncer^{6,7} Las pró-

Aislamientos por candid ID		
Color de las colonias	Nº de aislamientos	Especie Compatible
<i>Azul celeste</i>	66	<i>C. albicans</i>
<i>Rosa pálido</i>	2	<i>C. tropicalis</i> , <i>Candida lusitniae</i> , <i>C. gililermundii</i> , <i>Candida keyfr</i>
<i>Rosa intenso</i>	1	
<i>Blanca cremosa</i>	2	<i>Otras levaduras</i>
<i>Total</i>	71	<i>100% aislamientos</i>

Tabla 4

tesis dentarias mal ajustadas, predisponen la mucosa bucal a *C. albicans*. El embarazo y la diabetes son causa predisponentes de vaginitis a candida y de otras regiones del organismo⁸. Las endocarditis micóticas post operatorias y en drogadictos son frecuentes. La ubicuidad, adaptabilidad y patogenicidad de *C. albicans* y especies relacionadas, mantiene a estos hongos constantemente como causantes de importantes micosis primarias y otras formas nuevas de candidiasis que complican el cuadro del diagnóstico al agregarse como agentes secundarios en muchos pacientes con otras enfermedades y sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos, corticoides y quimioterapia.

C albicans se adhiere a los materiales de relleno de la prótesis. La habilidad de este microorganismo para adherirse a las superficies expuestas por el nivel de fluidos, es un requisito previo para que se lleve a cabo una colonización. En consecuencia la adhesión microbiana es el primer paso en el desarrollo de la infección. Como resultado, la adhesión de *C. Albicans* a las superficies bucales ha sido el centro de atención de varios estudios y de una variedad de modelos "in vitro" que se han usado para examinar la adhesión a materiales de resina acrílica que permiten también diferenciar los cultivos mixtos, otra actividad enzimática permite la diferenciación de otras colonias en color rosa, orientando hacia otro tipo de levaduras.

Si bien se conoce la capacidad de oportunista de *C albicans*, poco se sabe sobre la epidemiología de este agente. Según varios estudios realizados en EEUU se demostró que el 7,9% de las infecciones nosocomiales era producida por hongos⁹⁻¹²

Según un estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina¹³ la incidencia de candidemias aumentó en un 500% en hospitales de alta complejidad con un incremento de la levaduras no *C. albicans* aunque *C albicans* se mantiene en un 40,75%.

Materiales y Métodos

En una población de 132 estudiantes de segundo año de la carrera de odontología de entre 19 y 21 años, 82 mujeres y 50 varones, se obtuvo una muestra de saliva sin estimulación mecánica que con un plazo de tiempo no mayor de una hora se llevó al laboratorio.

Cada muestra de saliva se sembró simultáneamente y por inoculación directa en los medios de Agar sabouraud glucosado (Laboratorio Britania S.A.) SabCAG preparado en pico de flauta con incubación 28° C y 37° C y en Candid ID (Bio Merieux) a 37° C con lectura a las 24 y 48 hs.

Como se observa en la tabla Nº 1 de las 132 muestras de saliva sembradas en el medio SabCAG sólo en 86 se realizaron aislamientos por cultivo (65,15%), y al efectuar la coloración de Gram Nicolle de los 86 aislamientos positivos en 64 (74,5%) se observaron solamente levaduras, cinco cultivos de muestras (5,8%) eran cultivos mixtos (levaduras y bacterias Gram positivas) y en 17 placas (19,7%) sólo se aislaron bacterias. Tabla Nº 2

En todos los aislamientos se investigó el desarrollo de tubo germinativo de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se suspendió un inóculo muy pequeño de células de levadura, en condiciones de esterilidad, a partir de una colonia aislada, en 0,5 ml de suero de oveja.
2. Se incubaron los tubos a 35 – 37 C durante un período de sesenta minutos.
3. Cada treinta minutos se realizó estérilmente una toma del material tomando una gota de la suspensión y colocándola en un portaobjeto.
4. Se realizó la lectura al microscopio óptico buscando la presencia de tubos germinativos.

Interpretación de la lectura¹⁴: se consideró positivo un apéndice con la mitad del ancho y tres o cuatro veces el largo de la célula de la que emerge. En la mayor parte de los casos no se observó constricción en el origen del tubo

germinativo² La sola presencia de un tubo germinativo se consideró como de valor diagnóstico.

De los 69 aislamientos de levaduras solamente desarrollaron tubo germinal 66.

Por Candid ID como vemos en la tabla N° 3 se realizaron 71 aislamientos de levaduras. De los 71 aislamientos positivos por Candid ID, como se detalla en la tabla N° 4, en 66 muestras se observó desarrollo de colonias azul celeste compatibles con *C albicans*, en 2 muestras se aislaron colonias color rosa pálido y 1 muestra se aislaron colonias color rosa intenso ambas compatibles con *C. tropicalis*, *Candida lusitniae*, *C gilliermondii* y *Candida keyfr*. En 2 muestras se aislaron colonias color blanco cremoso compatibles con otras levaduras.

La identificación por Candid ID fue sencilla, las colonias de *C albicans* se observaron redondas, lisas y con un breve relieve con bordes definidos y coloración azul celeste, toman este color debido a la hidrólisis específica del sustrato hexosamidasas cromogénico en presencia de un inductor de enzimas. Fig N° 1

Comparando los 69 casos de aislamientos de levaduras (64+5) por cultivo en Agar Sabouraud glucosado y los 71 aislamientos por cultivo directo en Candid ID se comprueba que sólo hay una diferencia de 2 aislamientos (2,8 %), siendo Candid ID más sencillo y rápido de leer, por otra parte el aislamiento de levaduras en el medio de Agar Sabouraud glucosado se vio comprometido por la presencia de bacterias en 22 muestras de saliva, 17 aislamientos puros de bacterias y 5 mixtos.

Con referencia a los aislamientos en las muestras de saliva vemos que un porcentaje mayor de la mitad de los individuos aparentemente sanos evaluados son portadores de algún tipo de levadura, predominando en esta muestra *C albicans*.

Con estos resultados se sugiere que en un hospital escuela, donde se necesite un diagnóstico rápido, el medio Candid ID es más específico, sencillo, y práctico aunque no más económico que el cultivo en medio de Agar.



Figura 1- 12 cepas de *Candida* spp. aisladas en Candid ID Sabouraud Glucosado.

Referencias

1. KWON-CHUNG KJ, LEHMAN D, GOOD C, MAGEE PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 49: 571-575, 1985
2. SANDSTROM RE, STOCKMAN L. Germ tube positive *Candida tropicalis*. *Am J Clin Pathol*. 69: 365-366, 1978
3. MACKENZIE DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*. 15: 563-565, 1962
4. ODDS FC. *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol*; 15: 1-5, 1987
5. IACOPINO AM, WATHEN WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *JADA*; 123: 46-51, 1992
6. ALTERAS I, ARYLEI J. The incidence of *Candida albicans* in the last day of pregnancy and the first day of the newborn. *Mycopathology*; 72: 85-87. 1980
7. BÉTRÉMIEUX P, CHEVRIER S, QUINDÓS G, SULLIVAN DJ, POLLONELLI L, GUIGUEN C. Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a *Candida albicans* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis*; 13: 899-905, 1994
8. QUINDÓS G, RIBACOBA L, CONTRERAS I, AGUIRRE JM. Tratamiento de las candidiasis orofaríngeas. *Rev Iberoam Micol*; 13 (supl): 11-15, 1996
9. BIKANDI, J., MILLÁN, R., REGÚLEZ P., MORAGUES M. D., QUINDÓS, G., PONTÓN, J.. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 369-74. (1998)
10. BUDTZ-JÖRGENSEN E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. *Diagnosis of oral candidosis*. *Acta Odontol Scand*; 48: 37-43. 1990
11. CONTRERAS I, PONTÓN J, QUINDÓS G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin. Infect. Dis*; 18: 480-481, 1994
12. DELGADO W, AGUIRRE JM. Las micosis orales en la era del sida. *Rev Iberoam Micol*; 14: 14-22, 1997
13. RODERO L, DAVEL G, SORIA M, VIVOT W, CÓRDOBA S, CANTEROS C E, SAPORITI A, Y PARTICIPANTES DEL GRUPO EMIFN. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. *Rev. Arg. microbiol V37*, 4:189-195, 2005
14. CAMPBELL CK et all. Identification of pathogenic Fungi Public Health Laboratory Service London 1996

Dirección de E mail:

pherimida@fodonto.unr.edu.ar

Fax:

0341 4400493

0341 4804608