

Sensibilidad y especificidad entre dos medios cromogénicos para la identificación de *Candida* spp

Arturo Ángel Cortés Figueroa*,
Alondra Aguilar Santana**,
Oscar Carrera Martínez*,
Sara Juárez*,
Elva Bazán Mora**,
Laura Rosio Castañón Olivares**.

Sensitivity and specificity of two Chromogenic media for *Candida* spp identification

Fecha de aceptación: abril 2010

Resumen

ANTECEDENTES. Las micosis en México han aumentado su incidencia de manera importante y el género *Candida* es uno de los principales causantes. La identificación de especies por los medios cromogénicos CHROMagar™*Candida* e ID2™*Candida* es frecuente; en la literatura se encuentran diversos reportes aconsejando el uso de uno u otro medio. El objetivo de este estudio es conocer la eficiencia de cada uno de esos dos medios de cultivo para la identificación de especies de *Candida*.

MATERIAL Y MÉTODO. A partir de pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, se obtuvieron 100 cultivos de *Candida* spp, que fueron sembrados en los medios cromogénicos CHROMagar™*Candida* e ID2™*Candida*. Asimismo, y de manera simultánea, los cultivos fueron sometidos al auxanograma automatizado (VITEK®), tomándose los resultados de éste último como referencia para calcular la sensibilidad y especificidad de cada medio cromogénico.

RESULTADOS. En CHROMagar™*Candida*, la sensibilidad y especificidad mostradas para *C. albicans* fueron de 94 y 81% respectivamente, y en ID2™*Candida*, de 90 y 70%.

CONCLUSIONES. Por su sensibilidad, ambos medios cromogénicos son útiles para ubicar *C. albicans*; sin embargo, por la poca especificidad que ambos muestran, no se recomiendan para identificar de manera específica algunas *Candida* no *albicans*, debido a lo cual se hace necesario recurrir al uso de otros métodos.

Palabras clave: ID™*Candida*, CHROMagar™*Candida*, sensibilidad, especificidad.

Abstract

BACKGROUND. Mycosis in Mexico have increased significantly its incidence and the *Candida* genus is one of the main causes. Species identification by chromogenic media CHROMagar™*Candida* and ID2™*Candida* is common in the literature and various reports are advising about its use. The aim of this study is to know the efficiency of each of these two culture media for *Candida* species identification.

MATERIAL AND METHOD. From patients of Centro Medico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, were obtained 100 *Candida* spp sample, which were cultured on chromogenic media CHROMagar™*Candida* and ID2™*Candida*. Simultaneously, the sample were subjected to automated auxanogram (VITEK®), and the results were the reference for calculating sensitivity and specificity for each chromogenic medium.

Results. Respectively, sensitivity and specificity shown for *C. albicans* was 94% and 81% for CHROMagar™*Candida*, and 90% and 70% in ID2™*Candida*.

CONCLUSIONS. For the sensitivity, both chromogenic media are useful for identifying *C. albicans*, but due to poor specificity that shown, are not recommended to identify some defined *Candida* non *albicans*, because of which it becomes necessary to use other methods.

Keywords: ID™*Candida*, CHROMagar™*Candida*, sensitivity, specificity.

* Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE;

** Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia:
Laura Rosio Castañón

Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina, UNAM. Segundo piso, edificio A. Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria. C.P. 04510. México, DF.

Introducción

Candida albicans es considerada la especie más frecuentemente aislada en pacientes con candidosis. Sin embargo, en la última década se ha observado un aumento en la incidencia de especies de *Candida* no *albicans* como agentes causales de diversos cuadros clínicos, por ejemplo: *C. glabrata*, aislada de tracto genitourinario; *C. tropicalis*, causante de septicemia; *C. krusei*, aislada de mucosas; *C. kefyr*, a partir de infecciones pulmonares; y *C. parapsilosis*, como causante de endocarditis y endoftalmitis.¹⁻³

El cambio en la incidencia de especies no *albicans* se ha visto reflejado en un aumento importante de recidivas y fracasos terapéuticos en los pacientes, especialmente en aquellos procesos patológicos donde se encuentran involucradas *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, organismos que muestran una elevada resistencia a antifúngicos azólicos.²⁻⁴ Por lo anterior, en la actualidad se ha subrayado la importancia de conocer la especie del agente causal.

La identificación de las especies de *Candida* va desde los métodos caseros (filamentación en suero, producción de hifas y pseudohifas en medios pobres),^{1,3,4} presencia de pigmentos en medios cromogénicos,⁵⁻¹² pasando por los auxanogramas automatizados, hasta la amplificación por PCR de genes o secuencias de bases especie-específicas.^{1,3,4}

La identidad de *Candida* por medios cromogénicos fue inicialmente reportada por Nickerson en 1953, quien a través de la reducción de sulfitos contenidos y la morfología presentada en su medio BIGGY, diferenciaba *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parakrusei* y *C. stellatoidea*.^{3,4} Posteriormente, en 1958, Pagano y colaboradores adicionaron al medio de Sabouraud dextrosa agar, cloruro de trifenil-tetrazolio, compuesto químico cuya reducción produce colonias en varias tonalidades, permitiendo diferenciar a *C. albicans* y *C. krusei* de otras especies de *Candida*.³

En los últimos años se ha promovido el uso de medios de cultivo con cromógenos (cuadro 1), método que resulta muy atractivo por la sencillez y rapidez con la que, según los fabricantes, se obtiene la identificación a nivel de especie.

En nuestro país, CHROMagar™ *Candida* e ID2™ *Candida* (medio reformulado de ChromID™ *Candida*) son los cromogénicos más difundidos y utilizados para aislamiento e identificación primaria a partir de diferentes especímenes biológicos.⁵⁻¹²

Con el fin de conocer la eficiencia de cada uno de esos medios de cultivo en la identificación de especies de *Candida*, se elaboró el presente estudio, en el que medimos la sensibilidad y especificidad mostradas por cada uno de ellos en aislamientos clínicos.

Cuadro 1
Características de cinco medios cromogénicos para identificación de *Candida* spp, según la carta de color de cada uno de los fabricantes

Especie	Agar cromogénico para <i>Candida</i> (CONDA, Madrid, España)	Agar Cromo <i>Candida</i> (Valdés y Cía. Ltda, Santiago, Chile)	Candiselect®4 (BioRad, EUA)	Chromagar™ <i>Candida</i> (Becton Dickinson, EUA)	ChromID™ <i>Candida</i> (Biomerieux, Francia)
<i>C. albicans</i>	Verde	Verde	Rosado-morado	Verde	Azul
<i>C. glabrata</i>		Rosado-rojizo-púrpura	Turquesa. Colonias brillantes, planas de textura lisa y con bordes regulares	Rosado oscuro-violeta*	Blanco
<i>C. tropicalis</i>	Azul	Azul	Turquesa intenso. Colonias con volumen, de textura lisa y con bordes regulares	Azul metálico	Rosado*
<i>C. krusei</i>	Lila-rosado	Rosado pálido con borde blanco	Turquesa difuminado. Colonias de apariencia seca y superficie arrugada y con bordes irregulares	Rosado pálido-lila	Blanco*
<i>C. parapsilosis</i>		Blanco marfil		Rosado oscuro-violeta	Blanco

* El medio está diseñado para la especie señalada, aunque ese mismo color pueden presentarlo otras especies.

Material y métodos

Los aislados estudiados provinieron de especímenes clínicos obtenidos de pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, colectados del 7 de abril de 2007 al 4 de septiembre de 2008.

Los productos patológicos fueron sembrados en agar dextrosa Sabouraud (ADS) e incubados durante 48 horas a temperatura ambiente. De aquellos en los que fue observado el desarrollo de colonias levaduriformes, fueron seleccionados 100 y aislados con morfología compatible al género *Candida*: colonias de aspecto cremoso, suaves, poco elevadas, lisas o arrugadas y de color del blanco al amarillo tenue. Microscópicamente: levaduras ovaladas de 2x5 a 4x8 μm , con o sin pseudomicelio y Gram positivas.

Esas colonias fueron purificadas por subsecuente resiembra en ADS y, posteriormente, se sometieron a una identificación bioquímica mediante el sistema VITEK[®], que funcionó como método de referencia. Simultáneamente, las levaduras puras fueron subcultivadas en los medios de prueba: CHROMagar[™]*Candida* e ID2[™]*Candida* y, de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, fue registrada la identificación de los microorganismos, la cual se comparó con la referencia.

Para realizar el cálculo de sensibilidad y especificidad de cada medio cromogénico se construyeron tablas de contingencia,¹³ donde las variables evaluadas correspondieron a los resultados obtenidos por VITEK[®], en cada una de las 100 muestras (resultado esperado), contra los resultados de los dos medios cromogénicos (resultado observado).

Tomando en cuenta que la evaluación anterior no consideró el porcentaje de coincidencia que pudiera ser debido al azar, se realizó como medida de validez estadística el coeficiente de concordancia Kappa (κ),¹³ para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. La magnitud de las diferencias en sensibilidad entre los medios cromogénicos estudiados fue medida con la prueba de significancia estadística Chi cuadrada (χ^2).¹³

Finalmente, los resultados de los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos en este estudio fueron comparados con aquellos reportados por otros autores.

Resultados

De los 100 cultivos estudiados, 51% fue obtenido de material biológico proveniente de vías respiratorias (exudado faríngeo, lavado bronquial y esputo), 20% de tracto genitourinario (orina y exudado vaginal), 8% a partir de sondas y catéteres, 7% de secreciones (escara, úlcera, herida, absceso) y, el resto, de otros productos (líquido de diálisis, secreción ótica, líquido cefalorraquídeo, hemocultivo, etcétera) (cuadro 2).

En la cuadro 3 se hace evidente la diferencia para identificar especies de *Candida* no *albicans*, entre los métodos usados; especialmente el caso entre *C. krusei* y *C. glabrata*, donde se aprecia que ambas especies son confundidas con facilidad cuando cualquiera de los dos cromogénicos son utilizados para su identificación.

Cuadro 2
Muestras biológicas a partir de las cuales fueron aisladas las colonias de *Candida* analizadas

Especimen	Número
Vías respiratorias	51
Tracto genitourinario	20
Sondas y catéteres	8
Secreciones	7
Otros	14
TOTAL	100

Cuadro 3
Frecuencia de especies en 100 aislamientos de *Candida* según tres métodos de identificación

Especie	VITEK [®]	CHROMagar [™] <i>Candida</i>	ID2 [™] <i>Candida</i>
<i>C. albicans</i>	78	79	80
<i>C. tropicalis</i>	8	8	7
<i>C. krusei</i>	1	13	13
<i>C. glabrata</i>	10	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	3	0	0

El coeficiente de concordancia respecto de *C. albicans* resultó $\kappa=0.70$ para ID2[™]*Candida* y $\kappa=0.61$ para CHROMagar[™]*Candida*, lo cual se interpreta como un excelente grado de concordancia,¹³ en ambos medios. Para *C. tropicalis*, $\kappa=0.86$ para CHROMagar[™]*Candida* (casi perfecta concordancia)¹³ y $\kappa=0.73$ para ID2[™]*Candida*, (excelente concordancia). Por el contrario, en *C. krusei*, $\kappa=0.13$ para ambos cromogénicos, lo que implica ninguna concordancia.¹³ En cuanto a *C. glabrata*, la concordancia fue nula.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia real entre los medios analizados; para la identificación de *C. albicans* y *C. tropicalis*, ambos medios concuerdan excelentemente con el método de referencia VITEK[®], pero para otras especies como *C. krusei* y *C. glabrata* son discordantes, con respecto a la referencia.

Evaluamos la sensibilidad y especificidad de cada uno de los cromogénicos, exclusivamente para *C. albicans*, por ser la única especie que cualquiera de los dos medios identifica de manera definida. En CHROMagar[™]*Candida*, la sensibilidad y especificidad mostradas para *C. albicans* fueron de 94 y 81% respectivamente, y en ID2[™]*Candida*, de 90 y 70%. Aun cuando no hay una diferencia real entre

ambos medios ($\chi^2=6.98$, $p < 0.05$; no existe diferencia estadísticamente significativa), la mejor sensibilidad y especificidad fueron observadas con CHROMagar™*Candida* (cuadro 4).

Sobre la sensibilidad y especificidad de los medios cromogénicos, medidas por otros autores para *C. albicans*, muestran diferencias mínimas, estimándose para ambos

medios un excelente nivel de identificación, incluso cuando, al contrario de nuestros resultados, puede apreciarse cierta ventaja de ID2™*Candida* sobre CHROMagar™*Candida* (cuadro 4). Asimismo, es importante observar que los mismos parámetros tienen menor confiabilidad cuando se trata de definir *Candida no albicans* (cuadro 4).

Cuadro 4
Porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos por diversos autores, para dos medios cromogénicos

Autor	CHROMagar™ <i>Candida</i>				ID2™ <i>Candida</i>			
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida no albicans</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida no albicans</i>	
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
Peng y colaboradores. ⁶	100	94.6	de 90 a 100	de 78.8 a 95.4	100	95.3	de 90 a 100	de 79.6 a 95.3
Eraso y colaboradores. ⁷	91.7	97.2	de 97.4 a 100	98.7	91.7	97.2	de 97.4 a 100	de 96.6 a 100
Yücesoy y colaboradores. ⁸	100	100	de 15 a 100	de 99.5 a 100	de 97.7 a 100	de 93.8 a 96.3		
Ballesté y colaboradores. ⁹	de 88 a 99	de 96 a 100	de 90 a 96	de 88 a 100				
Yücesoy y Marol. ¹⁰	94	100	de 90.9 a 100	100				
García Martos y colaboradores. ¹¹	100	100	de 90.3 a 97.3	de 99 a 99.6				
Letscher Bru y colaboradores. ¹²					97.7			
Cortés Figueroa y colaboradores*	94	81			90	70		

* Datos del presente trabajo

Discusión

Para la identificación rápida de *Candida albicans*, ambos medios cromogénicos son igual de eficientes, ya que la discriminan fácilmente de otras *Candida no albicans*. Por el contrario, por los resultados obtenidos en concordancia y sensibilidad, ninguno de los dos cromogénicos es el adecuado para identificar definitivamente *Candida no albicans*.

Por lo anterior, el valor de los cromogénicos se reduce a considerarlos una herramienta útil sólo para la separación entre dos grupos: *C. albicans* y *Candida no albicans*; tomando en cuenta que cerca de 50% de los aislamientos clínicos corresponden a *Candida no albicans*, se recomienda utilizar el cultivo en harina de maíz y el auxanograma como métodos de identificación, superiores al uso de medios cromogénicos.

Nuestra experiencia mostró una ventaja de CHROMagar™*Candida* sobre el medio ID2™*Candida*, ya que

el primero, además de identificar *C. albicans*, también es específico para *C. tropicalis* (color azul), especie que es considerada la segunda en importancia clínica.

El auxanograma de VITEK® es un método específico y sensible, capaz de identificar especies diferentes a *Candida albicans*, aunque nuestra experiencia ha demostrado que ese método bioquímico, ocasionalmente, tiene sus fallas. Por lo anterior, apuntamos que la única forma de identificación segura es la amplificación de regiones específicas mediante PCR, que por cuestiones de tiempo y costos no es considerada como una técnica de identificación rutinaria en laboratorios y hospitales.

En nuestro país, el presente estudio es pionero en comparar los resultados de los medios cromogénicos más usados, CHROMagar™*Candida* e ID2™*Candida*, con los

obtenidos por un método de mayor sensibilidad y especificidad (asimilación por VITEK®), característica que permitió obtener una evaluación estadística de validez y confianza,

reduciendo al mínimo los errores aleatorios que otros estudios han mostrado, debido a que las evaluaciones efectuadas son de tipo cualitativo.

Bibliografía

1. Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: American Society Microbiology Press, 2001: 451 pp.
2. González GM, Elizondo M, Ayala J. "Trends in species distribution and susceptibility of blood stream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: Result of 3-Year (2004-2007) surveillance study". *J Clin Microb* 2008; 46: 2902-2905.
3. Guilarte C, Pardi G. "Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal". *Acta Odonto Venezolana* 2009; 47: 1-7.
4. Sánchez Flores MA. *Relación de Candida spp. obtenida de pacientes y su ambiente en la unidad de cuidados intensivos de adultos (UCIA) del Centro Médico Nacional (CMN) 20 de noviembre, ISSSTE*. Tesis de la carrera de Biología. México, DF. Facultad de Ciencias, UNAM, 2009: 59 pp.
5. Sendid B, François N, Standaert A, Dehecq E, Zerimech F, Camus D, Poulain D. "Prospective evaluation of the new chromogenic medium candiselect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species". *J Med Microb* 2007; 56: 495-499.
6. Peng CF, Lee KM, Lee SH. "Characterization of two chromogenic media of *Candida* ID2 and Chromagar *Candida* for preliminary identification of yeast". *J Biomed Lab* 2006; 19: 63-68.
7. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, Quindós G. "Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID2 for isolation and identification of *Candida Albicans* and other medically important *Candida* species". *J Clin Microb* 2006; 44: 3340-3345.
8. Yucesoy M, Ozbek OA, Marol S. "Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts". *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 245-247.
9. Ballesté R, Arteta Z, Fernández N, Mier C, Mousqués N, Xavier B, Cabrera MJ, Acosta G, Combol A, Gezuele E. "Evaluación del medio cromógeno CHROMagar *Candida*™ para la identificación de levaduras de interés médico". *Rev Med Uruguay* 2005; 21: 186-193.
10. Yucesoy M, Marol S. "Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY Agar for identification of yeast species". *Ann Clin Microb Antimicrob* 2003; 2: 8.
11. García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina JM, Marín P, Tallero E, Mira J. "Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar™ *Candida*". *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 131-135.
12. Lestcher-Bru V, Meyer MH, Galois AC, Waller J, Candolfi E. "Prospective evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID in comparison with candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species". *J Clin Microb* 2002; 40: 1508-1510.
13. Fletcher R. *Epidemiología clínica*. 4a edición. Lippincott Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health, 2008: 120-237.