



Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico

M^a Francisca Colom¹, Alejandro Jover¹ y Consuelo Ferrer²

¹Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Alicante; ²Departamento de I+D, Instituto Oftalmológico de Alicante, Vissum, Alicante

Resumen

Las infecciones por *Candida* son una importante causa de mortalidad y morbilidad en pacientes críticos. La detección rápida de la presencia de la levadura en sangre y otros tejidos es un objetivo que recientemente se intenta abordar aplicando distintos métodos moleculares de diagnóstico. Analizamos la sensibilidad y especificidad de los métodos aplicados a la detección de *Candida* en muestras clínicas de pacientes críticos y otros susceptibles de padecer candidiasis profunda. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), especialmente los que tienen como diana las secuencias de los genes ribosomales y sus espaciadores internos, muestran claramente una mayor sensibilidad que el cultivo y una especificidad equiparable a este. Todavía no hay propuestas claras en cuanto a la posible estandarización de la extracción y purificación del DNA y de los sistemas de lectura de productos, aunque la técnica de PCR a tiempo real con emisión de fluorescencia, parece la propuesta más interesante por la ventaja añadida de permitir la cuantificación de la carga fúngica y minimizar la manipulación de las muestras y por tanto el riesgo de falsos positivos.

Palabras clave

Candida, Diagnóstico, PCR, Paciente crítico no neutropénico

Molecular biology in the diagnosis of deep-seated candidiasis in the critically ill non-neutropenic patient

Summary

Candida infections are an important cause of morbidity and mortality in critically ill patients. Rapid detection of the yeast in blood and other tissues by molecular biology methods has been the goal of some recent studies. An analysis of the sensitivity and specificity of these methods assayed in clinical specimens from critically ill and other patients is carried out. PCR amplification of ribosomal genes and their internal spacers showed a higher sensitivity than culture based methods. A standardization of most of the methodological steps in molecular methods is needed. Real time PCR with fluorescent probes seems to be the most interesting proposal. It has the advantage of the possible quantification of fungal presence in tissues and minimizes the samples' contamination risk.

Key words

Candida, Diagnosis, PCR, Critically ill non-neutropenic patients

El paciente crítico constituye uno de los tres grupos más importantes de individuos hospitalizados susceptibles de padecer candidiasis profunda [16]. De hecho, la candidemia se considera actualmente la cuarta causa de septicemia en la mayoría de las Unidades de Cuidados Intensivos -UCIs- [1,5,20]. La infección fúngica no suele ofrecer manifestaciones clínicas definidas que permitan sospecharla [8,9], lo que sumado a la falta de un método

diagnóstico rápido y sensible, dificulta mucho el adecuado manejo del proceso. Los métodos convencionales basados en el cultivo, tienen una sensibilidad estimada de un 50% [6] y necesitan un mínimo de 48 h para ofrecer un diagnóstico [12]. Conseguir un método diagnóstico específico y sensible a la vez que rápido, permitiría la prescripción de un tratamiento antifúngico temprano, lo que se traduciría en un mejor pronóstico en estos y otros pacientes con infecciones fúngicas graves como la candidiasis invasora [6]. Por otra parte, la mayoría de estas candidiasis son de origen endógeno, producidas por levaduras que se encuentran colonizando el tubo digestivo o la mucosa genital de los propios individuos [11]. Esta situación complica la interpretación de los resultados ofrecidos por los métodos de diagnóstico convencionales, que como mucho, detectan e identifican la levadura en sangre y tejidos. Así pues, es necesario plantear como primer objetivo el desarrollo de métodos rápidos de diagnóstico, siendo necesario ulteriormente distinguir colonización de infección con todos sus matices. Por último, no hay que olvidar que estos pacientes suelen estar recibiendo terapia antifúngica, que puede ser en parte la responsable del elevado número de cultivos negativos [18].

Dirección para correspondencia:

Dra. M^a Francisca Colom Valiente
Microbiología, Facultad de Medicina
Universidad Miguel Hernández
Apartado 18
03550 Sant Joan d'Alacant, Alicante, España
Tel.: +34 96 591 9453
Fax: +34 96 591 9457
E-mail: colom@umh.es

Desde la década de los noventa, se han ido desarrollando y ensayando diversos métodos de diagnóstico de base molecular, en los que se persigue la detección de secuencias genómicas específicas de *Candida*, para conseguir un método rápido y fiable de diagnóstico de candidiasis invasiva. La base teórica es común en todos ellos y lo que los diferencia son los modos de abordar el objetivo y de revelar e interpretar la posible presencia del patógeno. Cualquier método de diagnóstico molecular para candidiasis, necesita definir al menos los siguientes aspectos: El mecanismo de extracción de DNA de la levadura; el sistema de eliminación de posibles moléculas que inhiban o entorpezcan la reacción de amplificación; la diana o dianas genómicas específicas y el sistema de lectura o detección del amplicón o amplicones. Una vez diseñado el sistema es necesario que sea aplicable a muestras clínicas, siendo especialmente importante que permita detectar *Candida* en sangre con una alta sensibilidad y especificidad.

Algunos de los métodos más interesantes descritos y ensayados hasta el momento, se resumen en la tabla. El uso de estos métodos de diagnóstico no ha sido valorado de forma exclusiva en el paciente crítico, aunque sí se especifica que se incluyen muestras de este tipo de enfermos en algunos de los estudios [1,13,23,Jover et al., resultados no publicados]. Esto es claramente demostrativo del incipiente desarrollo de las técnicas moleculares. Aunque algunos trabajos se han realizado con grupos concretos de enfermos críticos y hematológicos [19,23], la mayoría no han alcanzado todavía la fase de valoración de efectividad en diferentes situaciones clínicas, sino que se centran en la demostración de la elevada especificidad y sensibilidad de los protocolos de manejo en el laboratorio y la necesaria comprobación de que las muestras clínicas susceptibles de estudio, no presentan inhibidores para el proceso de detección y/o amplificación de ácidos nucleicos. Por ello, muchos de estos estudios se realizan con muestras que son

inoculadas con diferentes especies de *Candida*, comprobando posteriormente la capacidad de detección del microorganismo inoculado, así como la correcta identificación de la especie (estudios tipo 1). Algunos de estos trabajos incluyen además la aplicación del método previamente ensayado, en muestras clínicas de pacientes hospitalizados (estudios tipo 2), y sólo unas pocas se realizan únicamente con muestras clínicas sospechosas de candidiasis (estudios tipo 3). La mayoría de estos dos últimos grupos de estudios son de tipo prospectivo (estudios P), generalmente muy poco discriminativos, ya que incluyen muestras de pacientes críticos junto con otros susceptibles de padecer candidiasis profunda (estudios C+O). Muy pocos manejan exclusivamente muestras de pacientes críticos (estudios C). En cualquier caso, las series de estudio de muestras clínicas son todavía de pequeño tamaño y no se ha establecido ningún criterio de estandarización metodológica para ninguna de las etapas de la aplicación clínica del método: extracción del DNA fúngico; purificación de DNA; detección de genoma específico, e identificación de agente causal. No obstante, y a la vista de los resultados de estos estudios, queda ampliamente demostrada la elevada sensibilidad de cualquiera de las propuestas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como una especificidad comparable, cuando menos, a la obtenida mediante cultivo. Por otra parte, la definición de las dianas específicas para género y especies de *Candida*, se están consensuando claramente en las regiones del DNA que codifican para los genes ribosomales y sus espaciadores internos (rDNA-ITS). Estas regiones ofrecen secuencias muy conservadas y estables para hibridación de los cebadores (los genes ribosomales), a la vez que regiones con variabilidad intragénero especie-específica (los espaciadores) que confieren una especificidad muy alta a la detección e identificación de especies de *Candida* [1,6,8]. Se estima que las levaduras poseen más de 150 copias de estos complejos genéticos ribosomales a lo largo

Tabla. Ensayos de PCR para diagnóstico de candidiasis profunda.

Tipo de estudio	Muestras		Método diagnóstico		Eficacia		Nº Referencia
	Tipo	Nº	Técnica	Diana	Sensibilidad	Especificidad	
3-P-NC 1	Sangre	72	PCR-REA	Gen P450	5 cel/ml	79,5%	19
	Sangre	16	PCR-LiPA	rDNA/ITS	2-10 cel/ml (100 fg)	var*	17
2-R-C	Suero	50	PCRsn ELISA yEIA	rDNA/ITS	1 cel/ml	99%	1
2-P-C+O	Hemocultivos positivos	249	Multiplex PCR	rDNA/ITS	96,9%	87,5%	3
2-P-NC 1	Sangre	601	PCR-SB	rDNA/ITS	1 UFC/ml (100%)	98%	6
	Sangre	92	PCR-SB	mtDNA	3 cel/0,1 ml	100%	18
1	Sangre	21	PCR-SB	rDNA/ITS	15 ± 5 UFC/ml	var*	12
	Sangre	122	PCR-rt	rDNA/ITS	5 UFC/ml (100%)	72%-97%	15
2-P-C+O 1	Sangre animal	Ne	PCR-EIA	rDNA/ITS	2 cel/200 µl (10 cel/ml)	var*	9
2-P-Ne	Hemocultivo positivo	24	Multiplex PCR	rDNA/ITS	20 cel/2 µl	100%	10
2-R-Ne	Varias muestras	156	PCR-ELISA	Gen SAP	1-4 cel/ml (100%)	100%	8
2-P-Ne	Hemocultivos positivos	150	PCR-EIA	rDNA/ITS	10 ² cel/200 µl (100%)	100%	22
3-P-C+O	Hemocultivo	210	PCR secuenciación	rDNA/ITS	100%	100%	13
2-P-Ne	Hemocultivo	81	PCR fluoresc	rDNA/ITS	10 ² cel/200µl	100%	21
3-P-Ne	Hemocultivos positivos	62	PCRrt	rDNA/ITS	≤1 fg DNA 100%	100%	20
2-P-Ne	Suero	24	PCR anidada	rDNA/ITS	1 pg DNA (73,3%)	Ne	4
2-P-Ne	Sangre	Ne	PCR anidada	Gen P450	<10 cel	100%	14
2-P-C+O	Fluidos estériles	228	PCRsn secuenciación	rDNA/ITS	≤1 cel/500 µl	100%	Jover et al., datos no publicados

Tipo de estudio: 1: realizados con cultivos y muestras clínicas inoculadas con *Candida* spp.; 2: optimizados con muestras inoculadas y posterior aplicación a muestras clínicas reales; 3: únicamente realizados con muestras clínicas; P: prospectivos; R: retrospectivos; C: muestras de pacientes críticos; C+O: paciente crítico y otros; NC: no incluye críticos; Ne: no se especifica tipo de paciente. Porcentaje de sensibilidad y especificidad expresados respecto a técnicas estandarizadas (cultivo).

del genoma, por lo que el método tiene una sensibilidad tan elevada que le permite detectar el DNA de menos de una célula en un volumen determinado de muestra [Jover et al., resultados no publicados].

Uno de los problemas más serios que presentan estas técnicas, es el alto riesgo de falsos positivos. Debido a la elevada sensibilidad del método, la posible contaminación de una muestra antes de la amplificación, aunque se produzca en bajo número, resultaría en un resultado positivo indistinguible del que arroja la presencia de una infección activa. Por otra parte, sobre esta misma base de elevada sensibilidad, existe el problema de diferenciar la colonización de la infección. La presencia de abundantes levaduras en mucosas donde *Candida* es un habitante normal, hace que con facilidad la colonización se extienda a sangre, mediante el fenómeno de translocación. Un método de diagnóstico muy sensible, puede detectar en sangre DNA de levaduras procedentes de la colonización de mucosas [7]. Este fenómeno tiene gran relevancia en los pacientes críticos, que con frecuencia están fuertemente colonizados por diferentes especies de *Candida*, especialmente aquellos que están recibiendo terapia antibacteriana de amplio espectro [2].

Los protocolos de PCR en tiempo real, en los que se minimiza la manipulación de la muestra y los productos de PCR, son una interesante propuesta para evitar estos problemas [15,20]. Este tipo de PCR, permite hacer una cuantificación del número de moléculas de genoma diana que se encuentran en la muestra [12,20]. La elevada sensibilidad del método sumada a la posibilidad de cuantificación, podrían facilitar el establecer criterios de valoración

para descartar falsos positivos por contaminación, así como matizar las situaciones de colonización e infección fúngica.

Cualquiera de los métodos basados en PCR han mostrado mayor rapidez que los convencionales que precisan el crecimiento in vitro de la levadura. Muchos de ellos estiman la detección e identificación de especies de *Candida* en menos de 24 horas [3,22, Jover et al., resultados no publicados].

Las técnicas de diagnóstico de laboratorio basadas en métodos de amplificación genómica, como la PCR, pueden resultar una alternativa rápida y más sensible que los métodos convencionales de cultivo, para la detección temprana de candidiasis profunda en pacientes críticos [8]. Algunas ventajas de estos métodos son la alta sensibilidad y especificidad que presentan, la rapidez de aplicación y la posibilidad de detectar tanto células vivas como organismos no viables [12,15]. La posibilidad de amplificar y de detectar secuencias específicas del genoma de cualquier organismo, ha abierto todo un nuevo horizonte a la metodología diagnóstica. Actualmente, al hablar de métodos rápidos de diagnóstico basados en detección de ácidos nucleicos, nos referimos de forma casi exclusiva a los basados en la PCR y a diferentes sistemas de revelado de sus productos, de los que la emisión de fluorescencia en PCR a tiempo real (PCRrt), parece ser el modelo más esperanzador para obtener una técnica estandarizada, con bajo riesgo de falsos positivos y que permita generar criterios de diferenciación entre situaciones de colonización e infección por *Candida*.

Bibliografía

- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2483-2489.
- Blot S, Vandewoude K. Management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Drugs* 2004; 64: 2159-2175.
- Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3466-3471.
- Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Lofdahl S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 479-485.
- De Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. *Haematologica* 2000; 85: 88-93.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, Bowden RA, Burik JV, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353-1360.
- Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 395-401.
- Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 962-967.
- Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3617-3622.
- García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 55-62.
- Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson H. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 228-231.
- Iwen PC, Freifeld AG, Bruening TA, Hinrichs SH. Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2292-2293.
- Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res* 2001; 156: 95-102.
- Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crockaert F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-Based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3293-3298.
- Maertens J, Vrebes M, Boogaerts M. Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur J Cancer Care* 2001; 10: 56-62.
- Martin C, Roberts D, Weide Mvd, Rossau R, Jannes G, Smith T, Maher M. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3735-3742.
- Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukasawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3344-3347.
- Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, d'Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1871-1875.
- Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson B. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5660-5664.
- Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 165-170.
- Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1454-1459.
- Tirodker UH, Nataro JP, Smith S, LasCasas L, Fairchild KD. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J Perinatol* 2003; 23: 117-122.