

Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*

Javier Pemán¹, Nieves Aparisi¹, Coral García-Esteban² y Miguel Gobernado¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, España

Resumen *Candida glabrata* es un patógeno emergente con menor sensibilidad a los azoles por lo que su identificación precoz ayudaría a la instauración del tratamiento adecuado. La prueba rápida GLABRATA RTT (Fumouze Diagnostics, Francia) es un nuevo método para la identificación de *C. glabrata*. Hemos comprobado su utilidad en la práctica diaria evaluando prospectivamente 168 levaduras aisladas en nuestro hospital. La especificidad y sensibilidad de la prueba fueron de 100 y 98,4%, respectivamente, y su utilización conjunta con el medio CHROMagar *Candida* permite la identificación de cuatro de las especies de *Candida* más frecuentes en la práctica asistencial (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *C. glabrata*).

Palabras clave *Candida glabrata*, GLABRATA RTT, Identificación rápida

Rapid identification of *Candida glabrata* using a new commercial kit

Summary *Candida glabrata* is an emergent pathogen with diminished susceptibility to azoles, thus a rapid identification of this yeast could be of help to choose the appropriate treatment. GLABRATA RTT (Fumouze Diagnostics, France) is a new *C. glabrata* identification test. To evaluate its utility in the clinical laboratory daily routine, we prospectively tested 168 yeasts isolated in our hospital. GLABRATA RTT results had a sensitivity of 98.4% and a specificity of 100%. The combination of CHROMagar *Candida* isolation medium and GLABRATA RTT test allowed the identification of the four most common species in the clinical practice (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *C. glabrata*).

Key words *Candida glabrata*, GLABRATA RTT, Rapid identification

En los últimos años se ha producido un constante aumento en la incidencia de infecciones fúngicas invasoras debido al crecimiento progresivo del número de pacientes inmunodeprimidos así como a la introducción de técnicas diagnósticas y terapéuticas más agresivas. Las especies del género *Candida* son la causa de la mayoría de las micosis profundas; sin embargo, a pesar de que hoy en día existen

descritas más de 150 especies dentro de este género sólo un reducido número se aíslan habitualmente en las muestras clínicas. Entre estas especies destaca *Candida glabrata*, considerada actualmente como un patógeno emergente que se aísla con mayor frecuencia después de *Candida albicans* en algunos países y a la que se asocia una mayor mortalidad en comparación a otras especies del género [4,5,12,14]. Esta particular virulencia de *C. glabrata* parece estar relacionada con una menor sensibilidad frente a los azoles así como a su capacidad para desarrollar resistencia a estos antifúngicos tras su administración profiláctica o empírica en poblaciones de alto riesgo [2,11,16], por lo que actualmente se recomienda la identificación rutinaria de las levaduras aisladas en estos pacientes.

Los métodos comercializados para la identificación de levaduras se basan en la asimilación e hidrólisis de hidratos de carbono y necesitan un tiempo de incubación prolongado (12-72 h). La introducción, desde hace unos años, de los medios de cultivo cromógenos ha ayudado notablemente a la identificación presuntiva de varias especies de *Candida*, pero estos medios de cultivo también necesitan incubarse durante 48 h para que las colonias desarrollen completamente su color y morfología. Por lo

Dirección para correspondencia:

Dr. Javier Pemán
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario La Fe
Av. Campanar, 21
46009 Valencia, España.
Tel.: +34 96 197 33 33
Fax: +34 96 197 31 77
Correo electrónico pemán_jav@gva.es

Aceptado para publicación el 6 de julio de 2004

©2004 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

tanto, para facilitar la instauración precoz de la terapia antifúngica adecuada se necesitan técnicas que permitan la identificación rápida de especies con sensibilidad disminuida a los azoles como *C. glabrata* [13]. Acaba de ser comercializada en nuestro país la prueba GLABRATA RTT (Fumouze Diagnostics, Francia), un método rápido que permite la identificación de *C. glabrata* en 20 min, a partir de su aislamiento, que está basado en la capacidad de esta especie para hidrolizar trehalosa pero no maltosa. Estudios previos ensayando GLABRATA RTT con aislamientos en CHROMagar Candida han confirmado la idoneidad de este medio cromógeno para la realización de esta prueba [7,17].

El objetivo de este estudio ha sido comprobar la utilidad en la práctica diaria de GLABRATA RTT para la identificación de *C. glabrata*, comparándolo con los métodos convencionales utilizados en nuestro laboratorio. Para ello, se estudiaron de manera prospectiva 168 levaduras aisladas en muestras clínicas en nuestro hospital durante cinco meses. Todos los aislamientos fueron identificados mediante métodos habituales, incluyendo su morfología en medio CHROMagar Candida (Izasa, España) y la asimilación o fermentación de azúcares en sistemas comercializados, como el sistema automatizado VITEK 2 YBC (bioMérieux, Francia) o la galería Auxacolor (Bio-Rad, Francia).

El test GLABRATA RTT es un método sencillo que precisa un pequeño inóculo para su realización y cuyos resultados se obtienen en menos de 20 min, por lo que actualmente es la técnica comercializada más rápida para la identificación de *C. glabrata*. GLABRATA RTT consiste en un panel plástico de tres pocillos con medio deshidratado (T, M y B); los pocillos T y M contienen trehalosa y maltosa, respectivamente, y si éstos azúcares son asimilados por la levadura, se origina glucosa que es detectada mediante una reacción de oxidación. El pocillo B se utiliza como control y manifiesta la presencia de cualquier carbohidrato libre que procedente del medio de cultivo pudiera dar lugar a un resultado falso positivo en los otros pocillos. Sólo con las cepas de *C. glabrata* se obtiene un resultado positivo en el pocillo de trehalosa y negativo en el de maltosa; las demás levaduras son trehalosa negativa o positiva, pero en los casos positivos, la maltosa también es positiva.

Para la realización de la prueba se siguieron cuidadosamente las indicaciones del fabricante. Partiendo de una suspensión con cuatro a seis colonias, de medio CHROMagar Candida, en 100 µl de agua destilada (turbidez 3 en la escala McFarland) se depositaron 25 µl en cada uno de los pocillos (T, M y B). Después de incubar el panel durante 10 min a temperatura ambiente, se añadieron 25 µl de reactivo revelador. El panel se volvió a incubar otros 10 min y se procedió a la lectura visual de los pocillos; los resultados positivos adquirieron una coloración anaranjada-marrón, mientras que la falta de coloración se correspondió con un resultado negativo (Figura). Las pruebas con el pocillo B positivo se consideraron como no valorables.

En total, se estudiaron 168 cepas de levaduras, 39 aislamientos procedían de sangre y otras muestras clínicas habitualmente estériles (peritoneo, lavado broncoalveolar y orina) y el resto de muestras superficiales, digestivas o respiratorias (piel, uñas, mucosa esofágica, mucosa nasofaríngea, mucosa bucal, mucosa vulvo-vaginal, heridas, punta de catéter, broncoaspirado, esputo y heces). La distribución por especies de estos aislamientos fue: 129 *C. glabrata*, 20 *Candida parapsilosis*, siete *Candida tropicalis*, cuatro *Candida guilliermondii*, tres *Candida kefyr*, y un aislamiento por especie de *Candida lusitanae*,

Candida pelliculosa, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Todos los aislamientos se subcultivaron previamente en medio CHROMagar Candida y se identificaron con el sistema VITEK 2 o con la galería Auxacolor. En seis cepas (4 *C. parapsilosis*, 1 *C. tropicalis* y 1 *C. guilliermondii*) el resultado del test no pudo ser interpretado debido a que el pocillo B fue positivo, por lo que fueron descartadas del estudio. De las 162 cepas restantes, 129 fueron identificadas como *C. glabrata* por los métodos habituales y, de ellas, 127 se identificaron como *C. glabrata* con el test GLABRATA RTT. Sólo se obtuvieron resultados falsos negativos repetidos en dos cepas; una de ellas, aislada de un lavado bronco-alveolar, fue trehalosa negativa y la segunda cepa, procedente de un esputo, fue maltosa positiva. Por lo tanto, la sensibilidad de GLABRATA RTT en nuestra serie fue del 98,4%. Ninguna de las 39 cepas estudiadas de especies distintas a *C. glabrata* se identificó como de esta especie mediante GLABRATA RTT, por lo que su especificidad y su valor predictivo positivo alcanzaron el 100% mientras que el valor predictivo negativo fue del 94,2%. Los valores obtenidos de especificidad y sensibilidad para el test



Figura. Esquema de la realización de la prueba GLABRATA RTT y ejemplo de un resultado positivo.

GLABRATA RTT han sido superiores a los publicados anteriormente con esta técnica (97,3-98,6% y 97,3-98,6%, respectivamente) [7,8,17]. Aunque en nuestra serie se incluyeron menos especies no-*C. glabrata* que en otros estudios, no hemos encontrado ningún resultado falso positivo. Estas elevadas tasas de especificidad y sensibilidad observadas son también superiores a las obtenidas con otros sistemas de identificación [3,6]. Por otra parte, el medio CHROMagar Candida permite la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en función del color y del aspecto característico que desarrollan sus colonias [12]; sin embargo, otras especies, entre las que se encuentra *C. glabrata*, desarrollan un color rosa inespecífico que no permite su fácil identificación, aunque algunos autores afirman lo contrario [1,15]. Por lo tanto, si se utiliza CHROMagar Candida como medio de aislamiento primario o de subcultivo, únicamente deberían ser ensayadas con GLABRATA RTT las colonias que desarrollen una tonalidad rosa inespecífica en este medio, con el subsiguiente ahorro de tiempo y reactivos.

En los últimos años también se han aplicado técnicas de biología molecular [9] y microespectroscopía [10] para la identificación rápida de levaduras. Sin embargo, aunque alguno de estos métodos puede identificar las

especies de *Candida* en menos de 6 h, su utilización se ve limitada a los laboratorios de investigación debido a su elevado coste y a los complejos requerimientos instrumentales. Por lo tanto, las técnicas rápidas fenotípicas continúan siendo las de elección en un laboratorio de Microbiología Clínica.

En nuestro estudio la prueba rápida GLABRATA RTT ha demostrado ser una técnica muy fiable y de fácil manejo para la identificación de *C. glabrata* en la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica y de gran utilidad

en aquellos laboratorios que no dispongan del medio CHROMagar *Candida*. Además, su utilización conjunta con este medio permite la identificación de cuatro de las especies de *Candida* más frecuentes en la práctica asistencial, entre las que se encuentran *C. krusei* y *C. glabrata*, especies que precisan una rápida identificación debido a su resistencia o menor sensibilidad al fluconazol y otros triazoles.

Bibliografía

- Bernal S, Martin Mazuelos E, Garcia M, Aller AI, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 201-204.
- Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 2002; 112: 380-385.
- Buchaille L, Freydière AM, Guinet R, Gille Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 479-488.
- Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1298-1302.
- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 80-96.
- Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39: 9-33.
- Freydière AM, Robert R. Rapid *Candida glabrata* identification with a commercial trehalase-maltase detection test. *Mycoses* 2002; 45 (Suppl 2): S18.
- Freydière AM, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, Monerau F, Vandenesch F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3861-3863.
- Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2860-2865.
- Maquelin K, Choo-Smith LP, Endtz HP, Bruining HA, Puppels GJ. Rapid identification of *Candida* species by confocal Raman microspectroscopy. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 594-600.
- Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; 100: 617-623.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 634-643.
- Pemán J, Cantón E, Orero A, Viudes A, Frassetto J, Gobernado M y los participantes españoles del Estudio Multicéntrico Epidemiológico de Candidemia en Europa patrocinado por la Confederación Europea de Micología Médica (ECCM). Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 30-35.
- Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61.
- Safdar A, Chaturvedi V, Koll BS, Larone DH, Perlin DS, Armstrong D. Prospective, multicenter surveillance study of *Candida glabrata*: fluconazole and itraconazole susceptibility profiles in bloodstream, invasive, and colonizing strains and differences between isolates from three urban teaching hospitals in New York City (*Candida* Susceptibility Trends Study, 1998 to 1999). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3268-3272.
- Tortorano AM, Faure O, Nicholoso A, Willinger B, Verweij P, Pemán J, Land G, Freydière AM. Routine use of the new commercial test, GLABRATA RTT for the rapid identification of *Candida glabrata* in six laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9 (Suppl 1): 252.