
Identificación de cepas del complejo *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas en la región de Valparaíso, Chile.

Identification of strains of the *Candida albicans* complex isolated clinical samples in the Valparaíso region, Chile.

Peggy Vieille O¹.

Rodrigo Cruz Choappa¹.

¹Centro de Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Infecciosas. Universidad de Valparaíso.

Autor de correspondencia: Peggy Vieille. peggy.vieille@uv.cl

Enviado: 10/03/2022

Aprobado: 15/03/2022

Financiamiento: Universidad de Valparaíso

Conflictos de interés: los autores declaran NO tener conflictos de interés.

Doi: 10.22370/bolmicol.2022.37.1.3217

Palabras Clave: *Candida albicans*, *C.dublinskiensis*, *C.africana*, genotipos.

Key words: *Candida albicans*, *C.dublinskiensis*, *C.africana*, genotypes.

Resumen

Introducción: *C. albicans* es reconocida como la especie más virulenta del género y representa la causa más frecuente de candidiasis en humanos. A nivel taxonómico, *C.albicans* se clasifica como un complejo de

especies estrechamente relacionadas que incluye a *C. albicans* sensu stricto (s.s), *C. dublinskiensis* y *C. africana*.

Objetivo: identificar las especies del complejo *C. albicans* aisladas desde distintas

muestras de pacientes de la quinta región de Valparaíso.

Materiales y método: Se identificaron 103 cepas del complejo *C. albicans*, aisladas desde muestras superficiales y profundas durante el año 2020. La identificación se realizó en base a morfofisiología y la amplificación del gen HWP1.

Resultados: Se identificaron 100 cepas como *C. albicans* s.s, 2 como *C. dubliniensis* y 1 como *C. africana*. Dentro de las cepas identificadas como *C. albicans* s.s se observaron cuatro patrones de tamaños de fragmentos genéticos.

Conclusiones: *C. albicans* s.s fue la especie más frecuente y en base al genotipo de HPW1 se describen cuatro patrones (H1 a H4).

Abstract

Introduction: *C. albicans* is recognized as the most virulent species of the genus and represents the major cause of candidiasis in humans. At the taxonomic level, *C. albicans* is classified as a complex of closely related species that includes *C. albicans* sensu stricto (s.s), *C. dubliniensis*, and *C. africana*.

Objective: to identify the species of the *C. albicans* complex isolated from different samples of patients from the fifth region of Valparaíso.

Materials and method: 103 strains of the *C. albicans* complex were identified, isolated from superficial and deep samples during the year 2020. The identification was carried out

based on morphophysiology and the amplification of the HWP1 gene.

Results: 100 strains were identified as *C. albicans* s.s, 2 as *C. dubliniensis* and 1 as *C. africana*. Within the strains identified as *C. albicans* s.s, 4 patterns of fragment sizes were observed.

Conclusions: *C. albicans* s.s was the most frequent species and based on the HPW1 genotype, four patterns are described (H1 to H4).

Introducción

Candida albicans es la levadura con mayor número de aislamientos desde las distintas muestras clínicas. Se encuentra comúnmente en la microbiota del tracto digestivo, el cual es su principal reservorio. Dentro de las presentaciones clínicas, son frecuentes la candidiasis orofaríngea, vaginal y vulvovaginal. Por otro lado, la candidemia es menos frecuente y suele presentarse en pacientes hospitalizados con neutropenia o con algún factor de riesgo (1, 2).

A nivel taxonómico, *C. albicans* se clasifica como un complejo de especies estrechamente relacionadas que incluye a *C. albicans* sensu stricto (s.s), *C. dubliniensis* y *C. africana* (1, 3). Morfológicamente, las colonias de este complejo se observan de color crema, brillantes o levemente cerosas, suaves y generalmente lisas. Algunas cepas se presentan rugosas y otras con bordes irregulares. Microscópicamente, las células son subsféricas, en gemación, con tamaños

entre $3-8 \times 2-7 \mu m$, con producción de pseudomicelio (4).

Para su clasificación, se han descrito pruebas fisiológicas que permitirían diferenciar las especies del complejo. Entre ellas, el color de las colonias en medios cromogénicos, el crecimiento a $45^\circ C$, producción de clamidosporas (diferencias en cantidad entre *C. albicans*/*C. dubliniensis* y negatividad para *C. africana*), diferentes morfologías de colonias cuando se cultiva en medios complementados (agar Staib, agar tabaco), además de la inhibición del crecimiento de *C. dubliniensis* en una mayor concentración de sal en el medio y la incapacidad de asimilar xilosa. Al ser especies tan estrechamente relacionadas morfológica, bioquímica y genéticamente, con estos métodos se ha reportado que la discriminación precisa a menudo es difícil y poco reproducible (5, 6).

A nivel molecular, Romeo y Criseo en el 2008 describieron una PCR convencional precisa para discriminar entre las 3 especies del complejo detectando el gen de la proteína 1 de la pared de las hifas (HWP1) (7). La expresión de este gen está altamente inducido durante la formación del tubo germinativo, característica de los aislados del complejo *C. albicans*. En la electroforesis, este método indica 3 diferentes fragmentos de ADN: 941 pb para *C. albicans*, 700 pb para *C. africana* y 569 para *C. dubliniensis* (7).

La correcta identificación de especies crípticas es relevante desde un punto de vista epidemiológico. Por ello, para la correcta identificación de estas especies genéticamente

relacionadas y tan cercanas, es necesario contar con técnicas de biología molecular.

El presente trabajo tiene como objetivo identificar las especies del complejo *C. albicans* aisladas desde distintas muestras de pacientes de la quinta región de Valparaíso, utilizando tanto las características morfofisiológicas como la amplificación del gen HWP1.

Materiales y método

El presente es un estudio descriptivo y prospectivo de 103 cepas del complejo *C. albicans*, aisladas desde muestras superficiales (piel, mucosa oral y vaginal, uñas, herida operatoria) y profundas (expectoración, aspirado traqueal, LBA, urocultivo y hemocultivo) durante el año 2020.

Para la identificación fenotípica, las cepas se sembraron en CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar Company Ltd., Francia), preparado según las especificaciones del fabricante e incubado a $35^\circ C$ por 48 horas. Para la identificación colorimétrica, el proveedor indica que se puede identificar a *C. albicans* por un color verde, *C. tropicalis* por azul metálico y *C. krusei* por rosa y rizado. No especifica discriminaciones para otras especies. Sin embargo, según el trabajo de Criseo (8), con este medio cromogénico se pudiesen diferenciar *C. albicans* s.s por un tono verde claro, *C. dubliniensis* con tono verde oscuro y *C. africana* con tono levemente verde.

Todas las cepas que mostraron algún tono de verde fueron traspasadas a agar leche/Tween 80 (preparación propia) e incubadas a 25°C por 72 horas para la morfología y producción de clamidosporas. El crecimiento a 45 °C se realizó en agar Sabouraud, incubando por 72 horas.

El patrón fisiológico de *C. dubliniensis* es similar al de *C. albicans*, excepto por la ausencia de crecimiento a 45 °C y por una producción más abundante de clamidosporas. *C. africana* presenta ausencia de crecimiento a 45°C y sin desarrollo de clamidosporas.

La identificación molecular se realizó empleando un protocolo de extracción manual con CTAB. Se amplificó el gen HPW1 con la metodología descrita por Romeo y Criseo (7) con los partidores Forward: 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3' y Reverse: 5'-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3'. La reacción de PCR consistió en una denaturación inicial a 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, *annealing* a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, con 10 minutos de extensión final. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% p/v con BrEt 0.5 mg/ml con electroforesis a 60 volt por 60 minutos.

Se utilizaron cultivos de referencia adquiridos en Westerdijk Institute: *C. albicans* CBS 562, *C. dubliniensis* CBS 7987 y *C. africana* CBS 8781. Todas fueron procesadas de igual forma que una cepa de origen clínico.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la distribución de las cepas aisladas desde los diferentes tipos de muestra.

Muestras profundas	
Aspirado traqueal	5
Expectoración	1
Hemocultivo	5
LBA	24
Urocultivo	7
Muestras superficiales	
Herida operatoria	1
Mucosa oral	4
Mucosa vaginal	11
Piel	17
Uñas	28
Total	103

Tabla 1. Número de cepas aisladas de muestras superficiales y profundas.

Morfológicamente, en el medio cromogénico a las 48 horas de incubación, las 103 cepas mostraron color verde con leves diferencias dentro del mismo tono que no fueron suficientes como para subclasificarlas. El desarrollo de clamidosporas se presentó en 97 cepas (95 *C. albicans* y 2 *C. dubliniensis*). En cuanto a la tolerancia de temperatura, 86 de las cepas crecieron a 45°C, todas *C. albicans*.

A las cepas sin desarrollo de clamidosporas (5 *C. albicans* s.s y 1 *C. africana*) se les repitió

la prueba de crecimiento en agar leche/Tween 80 confirmando el resultado previo.

El 86% de las cepas identificadas como *C. albicans* presentaron crecimiento a 45° C. Ninguna de las cepas de *C. dubliniensis* y *C. africana* se desarrolló a esta temperatura.

Molecularmente, se identificaron 100 cepas como *C. albicans* s.s, 2 como *C. dubliniensis* y 1 como *C. africana*. Dentro de las cepas identificadas como *C. albicans* s.s se observaron 4 patrones de tamaños de fragmentos. Se designaron como patrón tipo H1: único fragmento de ~ 900 ~1.000 pb, tipo H2: dos fragmentos de ~ 1.000 pb y ~ 900 ~1.000 pb, tipo H3: 900 ~1.000 y 800 ~ 900 pb y tipo H4: 800 ~ 900 pb. En la figura 1 se observan los patrones obtenidos de las cepas de *C. albicans* s.s junto al control CBS 562.

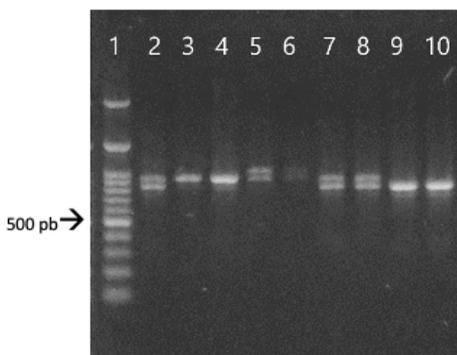


Fig 1. Carril 1: Ladder; 2: *C. albicans* CBS 562; 3-4: patrón H1; 5-6: patrón H2; 7-8: patrón H3; 9-10: patrón H4.

Las cepas de *C. dubliniensis* desde hemocultivo y LBA, *C. africana* lo fue desde mucosa vaginal. En la figura 2 se observan los fragmentos obtenidos junto a los controles CBS 7897 y CBS 8791.



Fig 2. Carril 1: Ladder; 2: *C. albicans* CBS 562 3: *C.dubliniensis* CBS 7987; 4: *C. africana* CBS 8781; 5 y 7: cepas clínicas.

Discusión

El complejo *C. albicans* es reconocido como la más virulenta del género y representa la mayor causa de candidiasis en humanos. *C. albicans* s.s suele estar presente como saprófito en mucosas y puede volverse invasiva como resultado de la disminución local o sistémica de los mecanismos de defensa del huésped (2,4). *C. dubliniensis* y *C. africana* son levaduras emergentes que están alcanzando importancia clínica y epidemiológica. *C. dubliniensis* se aísla predominantemente de lesiones bucales y orofaríngeas de pacientes con VIH / SIDA mientras que *C. africana* mayoritariamente se recupera desde muestras vaginales (2).

Analizando nuestros resultados, en cuanto a las características fenotípicas, la coloración del medio cromogénico mostró leves diferencias dentro de la gama del verde y tal como se comenta en la literatura revisada, los tonos obtenidos dependen de la marca del medio utilizado y del estado de la cepa a

analizar, pues se ha observado variaciones en el color de las colonias después del subcultivo y almacenamiento de los aislados, motivos por los que el uso de este marcador fenotípico debiera limitarse solo para la interpretación en cultivos primarios (8). La presencia de clamidosporas fue abundante en cepas *C. albicans* s.s y *C. dubliniensis*, no pudiéndolas diferenciar solo con esta característica, además el 5 % de las cepas de *C. albicans* s.s no mostró presencia de estas estructuras, pero sí crecimiento a 45°C. Si bien las pruebas morfofisiológicas no son suficientes para subclasificar a las especies dentro del complejo *C. albicans*, sí lo serían para diferenciarlas de otras especies del género (8).

Dentro de los resultados fisiológicos, el 14% de las cepas de *C. albicans* s.s no creció a 45 ° C. Este resultado se asemeja a otros citados por Chowdhary *et al.*(9), quienes realizan una amplia discusión sobre este test fisiológico de temperatura y su baja sensibilidad en la discriminación citando varios estudios en donde la negatividad de desarrollo de cepas de *C. albicans* oscila entre el 1,02% y el 35,7%.

Estudios moleculares muestran que, dentro de este complejo de especies, la presencia de *C. dubliniensis* y *C. africana*, fluctúa del 1 al 10 %. Analizando trabajos de nuestra región geográfica, en Argentina, Mucci *et al.* (10) obtuvo un 80.7% de *C. albicans* s.s y 3.8% de *C. dubliniensis* desde cepas aisladas de mujeres gestantes con candidiasis vulvovaginal. En 2019, en Honduras,

Fontecha *et al.* (1) trabajaron en la identificación de especies crípticas de 4 complejos de *Candida*. Dentro del complejo *C. albicans* encontraron que, de 66 cepas, el 92.4% correspondió a *C. albicans* s.s, un 4.5% a *C. dubliniensis* y un 3% a *C. africana*. De este trabajo son interesantes los fragmentos que obtuvieron en las electroforesis de las cepas de *C. albicans* s.s, ya que 8 de ellas mostraron una doble banda, compatible con cepas heterocigotas y 1 cepa mostró un alelo poco común, descrito como una variante natural homocigota de HWP1. En nuestros resultados observamos 4 patrones para las cepas de *C. albicans* las cuales coinciden en 3 (H1 a H3) con las descritas en el trabajo de Ngouana *et al.* (11) quienes de un total de 113 cepas, identificaron 5 genotipos. También coincidimos en que el mayor porcentaje de asilamientos lo presentó el patrón H1 con 66% en nuestro trabajo (entre 100 cepas) y para Ngouana *et al.* 57.52% (entre 113 cepas). Los demás patrones muestran un porcentaje menor en nuestra serie para el caso de H2 (7%) y H3 (15%) comparando con Ngouana *et al.* (H2, 18.58% y H3, 16.81%).

El polimorfismo genético obtenido en nuestro estudio agrega un patrón más y diferente a lo descrito en los trabajos revisados (2,10, 11, 12)(1, 2, 11, 12), pero coincidente con una cepa homocigota citada en Fontecha *et al.* (1) y descrita por Padovan *et al.*(13) quienes comunican que cepas homocigotas con este fragmento codifican para una proteína menos eficiente en la adhesión durante la formación de biofilms. Este patrón que denominamos

“H4” (único fragmento de entre 800 ~900 pb) estuvo presente en el 12% de nuestros aislados.

En cuanto al aislamiento de *C. africana*, la cepa provino desde una muestra vulvovaginal, tal como es la tendencia de los estudios revisados (1, 2, 6,14). Sin embargo, debemos mencionar que en 2007 Odds *et al.* (15) en un análisis molecular multicéntrico, reportó el primer aislamiento de una cepa de *C. africana* proveniente de Chile y además, de hemocultivo. Ello es muy interesante ya que sugeriría la potencialidad de esta especie para producir infecciones invasoras.

Teniendo como objetivo identificar las 3 especies del complejo *C. albicans*, podemos comunicar que este es el primer reporte de nuestro país en describir, en base al genotipo de HPW1, las variantes presentes en *C. albicans* sensu stricto dentro de cepas aisladas de población no clasificada como inmunodeprimida. Estos resultados nos instan a seguir estudiando a este complejo y, específicamente, a los genotipos de *C. albicans* ss. y relacionarlos con cuadros clínicos de mayor gravedad.

Conclusiones: de 103 cepas del complejo *C. albicans* aisladas de muestras superficiales y profundas de pacientes de la quinta región de Chile, *C. albicans* s.s fue la especie más frecuente y en base al genotipo de HPW1 se describen cuatro patrones genéticos (H1 a H4).

Referencias

1. Fontecha G, Montes K, Ortiz B, Galindo C, Braham S. Identification of Cryptic Species of Four Candida Complexes in a Culture Collection. J Fungi (Basel) 2019; 5. doi: 10.3390/jof5040117.
2. Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. Med Mycol 2014; 52: 636-40. doi: 10.1093 / mmy / myu003.
3. Gharehbolagh SA, Fallah B, Izadi A, Ardestani ZS, Malekifar P, Borman A, et al. Distribution, antifungal susceptibility pattern and intra-*Candida albicans* species complex prevalence of *Candida africana*: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 2020; 15 : e 0 2 3 7 0 4 6 . d o i : 1 0 . 1 3 7 1 / journal.pone.0237046.
4. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, et al. (2020) Atlas of Clinical Fungi, 4th edition. Hilversum. <https://www.clinicalfungi.org/>.
5. Mahnss B, Stehr F, Schafer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Mycoses 2005; 48 : 55 - 61 . d o i : 1 0 . 1 1 1 1 / j.1439-0507.2004.01054.x.
6. Naeimi B, Mirhendi H, Khamisipour G, Sadeghzadeh F, Ahmadi B. *Candida africana* in recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) patients: frequency and phenotypic and genotypic characteristics. J Med Microbiol

2018; 67: 1601-07.doi: 10.1099 / jmm.0.000834

7. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62: 230-33. doi: 10.1016 / j.diagmicrobio.2008.05.014

8. Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. *Mycoses* 2011; 54: 475-86. doi: 10.1111 / j.1439-0507.2010.01939.x

9. Chowdhary A, Randhawa HS, Kowshik T, Kathuria S, Roy P, Brandt ME. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 69: 440-42. doi: 10.1016 / j.diagmicrobio.2010.10.012.

10. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 2017; 34: 72-6. doi: 10.1016 / j.riam.2016.09.001.

11. Ngouana TK, Drakulovski P, Krasteva D, Toghueo RK, Kouanfack C, Reynes J, et al. Genetic diversity of the Hwp1 gene and HIS3, EF3, CDC3 microsatellites and antifungal susceptibility profiles of *Candida albicans* isolates from Yaounde HIV-infected patients. *Med Mycol* 2017; 55: 546-54. doi: 10.1093 / mmy / myw108.

12. Sharifynia S, Badali H, Sharifi Sorkherizi M, Shidfar MR, Hadian A, Shahrokhi S, et al.

In Vitro Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida albicans* Complex Isolated from Patients with Respiratory Infections. *Acta Med Iran*. 2016; 54: 376-81. PMID: 27306344.

13. Padovan AC, Chaves GM, Colombo AL, Briones MR. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. *Med Mycol* 2009; 47: 824-35. doi: 10.3109 / 13693780802669574.

14. Gumral R, Sancak B, Guzel AB, Saracli MA, Ilkit M. Lack of *Candida africana* and *Candida dubliniensis* in vaginal *Candida albicans* isolates in Turkey using HWP1 gene polymorphisms. *Mycopathologia* 2011; 172: 73-6. doi: 10.1007 / s11046-011-9401-2.

15. Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 1041-52. doi: 10.1128 / EC.00041-07.