

## ***Candida glabrata*: UN PATÓGENO EMERGENTE**

**Josep M. Torres-Rodríguez, Yolanda Morera y Olga López**

**Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica. Instituto Municipal de Investigación Médica. Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona**

La especie-forma *Candida glabrata* (Meyer y Yarrow, 1978), clasificada inicialmente como *Cryptococcus glabratus* por Anderson en 1917 y reclasificada en 1938 como *Torulopsis glabrata* por Lodder y De Vries, se define como una levadura productora de colonias lisas de consistencia blanda y de color crema, constituidas por células de 2,5-5 µm X 3,5-4,5 µm de diámetro. Presentan formas individuales ovoides, incapaces de formar pseudohifas o pseudomicelio o, como máximo, pueden formar una cadena corta de levaduras ovoides. La gemación es multilateral, no produce cápsula ni artrosporas, y tampoco se han descrito esporas sexuales. Se trata de una levadura haploide, a diferencia de *Candida albicans*. El interés por esta levadura reside en que es considerada como un patógeno emergente, con la particularidad de que un número considerable de cepas pueden ser resistentes *in vitro* a los antifúngicos triazólicos.

### **SITUACIÓN TAXONÓMICA**

*Candida glabrata*, como las otras especies del género *Candida*, pertenece a la clase *Deuteromycete/Fungi imperfecti*, orden-forma *Moniliales*, familia-forma *Cryptococcaceae*. La creación del género *Torulopsis*, distinto de *Candida*, fue debida principalmente a que, a diferencia de ese último, *Torulopsis* no presenta blastoconidios capaces de formar pseudomicelio o hifas verdaderas, ni en los tejidos que parasita ni en los cultivos. Actualmente, estas características se consideran insuficientes para efectuar una distinción en dos géneros y, desde 1978, se ha propuesto su integración en el género *Candida* aunque siguen considerándose como sinónimos. Ambos géneros, *Candida* y *Torulopsis*, poseen afinidades en las formas sexuadas de *Ascomycotina* o *Basidiomycotina*, lo que demuestra una importante heterogeneidad de los anamorfos. Estos hechos han determinado que otras especies, como *Torulopsis candida*, también se hayan reclasificado incluyéndola en el género *Candida*, con el nombre de *Candida famata*. En cualquier caso, todavía existe una cierta polémica en cuanto al encuadre taxonómico de *C. glabrata*, empezando por la nomenclatura, puesto que el nombre de *Torulopsis* definido por Berlese en 1895 es anterior al de *Candida* (Berkhout, 1923), por lo que, estrictamente, debería cambiarse éste último y aceptarse a *Torulopsis* como único género válido.

La estructura antigénica de *C. glabrata* ha sido determinada por varios autores, demostrándose que existe cierto grado de reactividad cruzada con otras especies consideradas más patógenas como *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Candida kefyr* y *Candida parapsilosis*. Sin embargo, se han descrito algunos componentes antigénicos característicos de esta especie, como el factor número 34, base del sistema de identificación comercializado con el nombre de Candida Check®.

## CONSIDERACIONES FISIOLÓGICAS

Los blastoconidios de *C. glabrata* no asimilan el inositol y no poseen pigmento carotenoide. Es inhibida por la cicloheximida al 0,01%. La temperatura máxima de crecimiento es de 43-45 °C y la temperatura óptima para las cepas de origen clínico es de 35-37 °C. Solamente fermenta la glucosa y la  $\alpha$ -trealosa. Estos mismos azúcares son asimilados además del D-gluconato y el DL-lactato. La gran mayoría de las cepas solamente utilizan la glucosa y la  $\alpha$ -trealosa en las pruebas de auxonograma comercial. La siembra de esta especie en medios cromogénicos como el CHROMagar®, origina colonias de color variable, de lila a púrpura. Las características diferenciales se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1. Características diferenciales de *C. albicans* y *C. glabrata*.**

Característica	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Blastoconidios	3-7x3-14 $\mu$ m	2,5-4,5x4-6 $\mu$ m
Seudohifas	Sí	No
Clamidosporas	Sí	No
Número de cromosomas	7-9, diploide	11, haploide
Asimilación de azúcares	G, S, M, T, GAL, A <sup>a</sup>	G, T <sup>a</sup>
Color en medios cromogénicos		
CHROMagar®	Verde	Lila-púrpura
Candida ID®	Azul	Blanco
Crecimiento en cicloheximida 0,1%	+/-	-
Virulencia experimental	+++	+
Resistencia triazoles	+	+++

<sup>a</sup>G: Glucosa; S: sacarosa; M: maltosa; T: trealosa; GAL: galactosa; A: arabinosa.

La proporción de guanina-citosina que caracteriza el DNA de *C. glabrata* es aproximadamente del 40%, posee 11 cromosomas y su DNA mitocondrial es una molécula circular de 19 Kpb, conteniendo el gen *var1* que presenta un 85% de homología con el gen *var1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a su carácter haploide, se considera que *C. glabrata* tiene mayores posibilidades de presentar mutaciones que otras especies diploides, como *C. albicans*. Se han aplicado técnicas de biología molecular que permiten diferenciar entre las especies de *Candida* y algunos autores proponen esta metodología, ya que sería mas reproducible y fácil de interpretar que algunas identificaciones fenotípicas. En 1999, Espinel Ingrof comparó, en tres laboratorios diferentes, 50 cepas de *Candida* identificadas mediante cariotipado en campo pulsante. La reproducibilidad interlaboratorio fue del 100% para *C. glabrata*, menor para *Candida lusitanae* (93%), *C. albicans* (90%), *C. parapsilosis* (83%) y *C. tropicalis* (82%). Otros autores consideran que estos métodos tienen más indicaciones para el estudio de la epidemiología de las infecciones producidas por especies de *Candida* distintas de *C. albicans*, como *C. glabrata*.

En diversas publicaciones, en las que se ha estudiado el aislamiento de *C. glabrata* de diferentes poblaciones y localizaciones, destaca la mayor frecuencia en los pacientes ancianos (27%) y con estomatitis debida a prótesis dental (22-25%). *C. glabrata* también se ha aislado en el 5-25% de las muestras de estómago y del 5-30 % de las de origen ginecológico u obstétrico en mujeres sin vaginitis. Esta especie se aísla con muy baja frecuencia de la piel normal (1-2%) y, por el contrario, se ha cultivado hasta en el 36% de las muestras de orina procedentes de pacientes hospitalizados.

## FACTORES DE VIRULENCIA

La ausencia de algunos factores de virulencia, como la producción de pseudohifas, consideradas como estructuras que incrementan la adherencia y penetración del hongo en

los tejidos, conduce a considerar que *C. glabrata* es menos virulenta que otras especies, como *C. albicans* o *C. tropicalis*. Este hecho es cierto cuando se utilizan modelos experimentales en animales de laboratorio; sin embargo, existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones por aquélla en los enfermos inmunodeprimidos, en quienes también se produce una elevada tasa de mortalidad. Aunque el conocimiento de los marcadores de virulencia en esta especie es escaso, algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped. Otros factores relacionados con una mayor virulencia, como el cambio en el fenotipo de las colonias, muy estudiado en *C. albicans*, también puede producirse en *C. glabrata*.

Algunas alteraciones del huésped que contribuyen al desarrollo de las infecciones por esta especie son la disminución en los niveles de IgA secretora vaginal, una menor respuesta inflamatoria y, sobre todo, una disminución cuantitativa o cualitativa de los linfocitos T, hecho que explica su mayor frecuencia en los paciente con sida, trasplantados y con neoplasias.

### **EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR *C. glabrata***

Las infecciones por el género *Candida* han aumentado su incidencia en las tres últimas décadas, constituyendo actualmente una causa importante de morbi-mortalidad, especialmente las hematógenas. Aunque *C. albicans* continúa aislándose como la especie más frecuente, se ha descrito un significativo aumento de otras especies entre las cuales, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las más importantes. Esta última es una especie ubicua aislándose, por ejemplo, de la cavidad oral y vaginal de sujetos sanos y en las manos de personal sanitario. La colonización por estas levaduras se incrementa con la prolongación de la hospitalización y el deterioro clínico del enfermo, considerándose esta colonización el primer paso de muchas infecciones.

*Candida glabrata* se aísla cada vez con mayor frecuencia de muestras clínicas, como agente de candidosis vaginal, o produciendo micosis sistémicas graves y candidemia en los enfermos críticos, en inmunodeprimidos y con neoplasias hematológicas o sólidas. En las mujeres afectadas de vaginitis con flujo aumentado, *C. glabrata* corresponde a la especie cultivada con mayor frecuencia después de *C. albicans*, variando según las series desde un 0,6 a un 36 %, con una frecuencia media entre el 15 y el 20%. También se han descrito algunos brotes epidémicos en las unidades de cuidados intensivos (UCI), considerados como infecciones nosocomiales. En un estudio realizado en Madrid por Muriel *et al*, en 2000, a partir de 108 cepas procedentes de muestras ginecológicas, 138 de la UCI neonatal y 71 de las UCI de adultos, *C. glabrata* fue identificada en el 19,4% de las muestras vaginales (consideradas infecciones comunitarias), en el 27,5% de las muestras neonatales, y en el 29,6% de las UCI de adultos. Estos datos demuestran el carácter predominantemente nosocomial de *C. glabrata* respecto al comunitario

Un estudio epidemiológico realizado por Abi-Sai *et al* en 1996, a partir de un número alto de episodios de candidemias en enfermos neoplásicos, permitió observar que seis de cada 1000 ingresos presentaban un episodio de candidemia, y que el 79% de éstas correspondieron a enfermos de la UCI. En este estudio se comprobó el aumento de la incidencia de las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* y se comprobó que *C. glabrata* ocasionaba el 11% de las sepsis, relacionándose principalmente con la presencia de un catéter venoso central y con la profilaxis con fluconazol. En los enfermos afectos de sida la candidemia es una complicación poco frecuente y, en general, tardía; aunque *C.*

*albicans* suele ser la especie más frecuente, *C. glabrata* también puede ser identificada como agente causal (Saballs *et al*, 2000).

Esta especie se aísla cada vez con mayor frecuencia en casos de candiduria, especialmente en los pacientes diabéticos, en quienes reciben tratamiento antibiótico múltiple o son portadores de una sonda urinaria. En un estudio retrospectivo para valorar los factores de riesgo para presentar una candiduria nosocomial por *C. glabrata* y *C. albicans*, realizado por Harris *et al* en 1999, se comprobó que el uso de fluconazol y quinolonas se asociaba específicamente con la candiduria por *C. glabrata*. Estos autores se cuestionan si es la resistencia a este antifúngico, mostrada por un alto número de cepas, la que ocasiona el reemplazo de *C. albicans* o se trata de un fenómeno independiente. En un estudio realizado en nuestro centro, en el 11% de los urinocultivos positivos en enfermos de UCI se aisló *Candida* y, de ellos, el 22% correspondieron a *C. glabrata* (datos no publicados). Por estas razones, esta levadura es considerada como un patógeno emergente en la mayoría de las publicaciones. En la tabla 2 se especifican los factores más destacados relacionados con la epidemiología de las infecciones por *C. glabrata*.

**Tabla 2. Características de las infecciones por *C. glabrata*.**

Infección comunitaria	Vaginitis
Infección nosocomial	Enfermos inmunodeprimidos y debilitados Ingresados en las UCI
Asociaciones	Frecuente con otras levaduras
Origen de la infección	Frecuentemente exógeno
Factores de riesgo de la infección sistémica	Sonda vesical (candiduria) Catéter vascular (candidemia) Antibioticoterapia de amplio espectro
Factores específicos de riesgo	Administración previa de fluconazol Hospitalización prolongada

## IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

*Candida glabrata* crece con facilidad a 37 °C en el medio de agar glucosado de Sabouraud, con o sin antibióticos, pero no se desarrolla en presencia de cicloheximida (actidiona). En aquel medio origina, en 24-48 h, unas colonias lisas, no adherentes, de color blanco o cremoso, más o menos brillantes e indiferenciables de la mayoría de otras especies de levaduras del mismo género. En medios cromogénicos, como el CHROMagar®, las colonias aparecen de color lila a púrpura. Se utilizan los mismos método de identificación que para otras levaduras del género *Candida*. Los datos negativos, en cuanto a la ausencia de pseudohifas o clamidosporas cuando se siembra la cepa en medios pobres, como el agar-crema de arroz o el agar harina de maíz, junto con la morfología y el tamaño reducido de los blastoconidios (3-4 µm) orientan hacia esta especie, pero solamente las pruebas bioquímicas del auxonograma y zimograma confirman la identificación.

Los sistemas manuales o automatizados de identificación suelen ser suficientemente discriminativos, ya que el patrón bioquímico de la especie la diferencia claramente de otras especies del género *Candida*. Este patrón puede resultar más semejante al de *Candida krusei*, aunque son de difícil confusión porque *C. krusei* presenta una morfología macro y microscópica muy diferente. Se han descrito algunos métodos rápidos, como el basado en la hidrólisis rápida de la trealosa (Pelltroche-Llacsauhanga *et al*, 1999). Este método permite la identificación de *C. glabrata* en tres horas, con una especificidad y sensibilidad del 99%.

Como se ha comentado anteriormente, también se han aplicado técnicas de identificación rápida utilizando métodos moleculares de amplificación por PCR. Este método

podría tener su utilidad para identificar la especie de *Candida* directamente de los hemocultivos, tal y como propusieron Hee Shin *et al* en 1997. Otros métodos moleculares utilizados para la identificación de esta especie incluyen el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis en gel de campo pulsátil, el RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y otras pruebas con DNA. Sin embargo, estos métodos tienen actualmente más aplicación para estudios de epidemiología molecular que para el diagnóstico clínico.

## RESISTENCIA *IN VITRO*

Los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos todavía son poco conocidos. En el caso de *C. glabrata* se ha podido demostrar que la resistencia a los azoles se debe a un incremento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y la existencia de una bomba de eflujo activa para el fluconazol. Cuando se habla de resistencias a los antifúngicos suelen mezclarse dos conceptos diferentes: por un lado, la ausencia de una respuesta clínica a las dosis terapéuticas del fármaco y, por otro, la presencia de unas concentraciones inhibitorias (o fungicidas) mínimas (CIM) elevadas para el antifúngico. En el primer caso, la falta de respuesta terapéutica suele estar asociada al estado de inmunodepresión del enfermo o a una biodisponibilidad insuficiente del fármaco. En el segundo caso, la resistencia puede ser primaria (innata) o bien secundaria (adquirida) al antifúngico administrado. Los resultados de las CMI pueden variar según el método utilizado para su determinación. Además, existen técnicas que, simplemente, no aportan el valor exacto de la CMI, pero permiten definir una situación de sensibilidad, resistencia o valores intermedios. En la actualidad, la gran mayoría de los laboratorios aceptan como técnica de referencia la propuesta por el Subcomité del NCCLS para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos y que está publicada en el documento M27-A que, con todas sus limitaciones, ofrece un método normalizado y unos valores de referencia para interpretar los resultados.

*Candida glabrata* es, generalmente, sensible a los derivados poliénicos, nistatina y anfotericina B. Sin embargo, desde la comercialización y el uso intensivo del fluconazol e itraconazol, se han descrito casos de resistencias *in vitro* a estos azoles y de falta de respuesta en enfermos con candidosis tratados con estos antifúngicos. Gran número de esos estudios se han realizado en pacientes seropositivos para el VIH, con candidosis orofaríngeas mixtas o exclusivas por *C. glabrata*. El uso de medios de cultivo cromogénicos para el aislamiento primario de estas levaduras ha permitido observar con mayor facilidad la existencia de más de una especie de *Candida*, hasta en el 25% de los cultivos. Las cepas de *C. glabrata* resistentes al fluconazol predominan entre los enfermos seropositivos para el VIH, principalmente los afectados de candidosis orofaríngea y esofágica, aunque se han encontrado cepas resistentes en casos de vaginitis e infecciones sistémicas en pacientes críticos, con o sin neutropenia. Si bien se describen resistencias primarias al fluconazol, las más frecuentes son las adquiridas. El hecho de que *C. glabrata* sea una levadura haploide podría favorecer el desarrollo de resistencias secundarias. La aparición de resistencia cruzada con otros azoles como el itraconazol, ketoconazol y voriconazol no es infrecuente. Al contrario que otras levaduras del género, *C. glabrata* es, habitualmente, muy sensible a la 5-fluorocitosina.

En un estudio multicéntrico publicado por Meis *et al*, en 2000, se analizó la sensibilidad de 2073 cepas de *C. glabrata* de diferentes orígenes y hospitales utilizando el método de difusión en agar con discos de 25 µg de fluconazol. La interpretación de los

resultados se basó en un análisis de regresión con el método de microdilución propuesto en el documento M27-A. Con este método se encontró que un 67% de los aislamientos producían un halo de inhibición superior a los 19 mm de diámetro, halo considerado como sensible. Con este mismo método, los mismos autores detectaron una sensibilidad al fluconazol del 99% para *C. albicans*, 94% en *C. tropicalis*, 90% en *C. parapsilosis*, y solamente del 26% para *C. krusei*.

Muriel *et al* (2000), utilizando el sistema Fungitest® que valora las cepas en sensibles, intermedias y resistentes, encontraron un 17,6% de cepas aisladas en infecciones vaginales comunitarias resistentes al fluconazol mientras que, en las muestras de pacientes adultos ingresados en la UCI, las resistencias eran del 21% y en neonatología del 1%. Para el itraconazol, las resistencias fueron algo superiores: 23,5%, 26,3%, y 1% respectivamente. En ningún caso detectaron resistencias a la anfotericina B.

De las 10 cepas de *C. glabrata* aisladas en el urinocultivo de 61 enfermos con candiduria ingresados en la UCI del Hospital del Mar de Barcelona, se encontró una con una CMI al fluconazol  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ , considerada resistente cuando se emplea el micrométodo normalizado propuesto por el NCCLS (Documento M27-A); otras tres presentaron valores de CMI entre 16-32  $\mu\text{g/ml}$ , considerados intermedios o de sensibilidad dependiente de la dosis en la terminología del documento del NCCLS (NCCLS, 1997) al fluconazol. Estos datos sugieren que, si bien el número de aislados estudiados es escaso, en torno al 60 % de las cepas de *C. glabrata* obtenidas de candiduria en enfermos críticos, serían sensibles a este antifúngico (Morera, Torres-Rodríguez, Alvarez Lerma *et al*, datos no publicados). Cuando se utilizan otros métodos de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, como el sistema comercial E-test®, también se describen valores de la CMI elevadas para el fluconazol e itraconazol. En una publicación anterior (Torres-Rodríguez *et al*, 1997), los 13 aislados de *C. glabrata* analizados mostraron CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  para el fluconazol, y 12 de ellos presentaron para el itraconazol una CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Todas las cepas fueron sensibles a la anfotericina B, con CMI  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ . Para la 5-fluorocitosina las CMI presentaron un intervalo de  $< 0,06$  a  $0,125$   $\mu\text{g/ml}$ , confirmándose la gran sensibilidad de esta levadura a este antifúngico.

El significado clínico de las resistencias *in vitro* de *C. glabrata* es un asunto debatido. Sin embargo, se considera que la resistencia contribuye al fallo terapéutico y que el manejo de los enfermos infectados con cepas resistentes no suele ser satisfactorio. La próxima aparición de antifúngicos dirigidos contra dianas diferentes del ergosterol podría contribuir a mejorar el pronóstico de este tipo de infecciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABI-SAI D, ANAISSIE E, UZUN O, *et al*. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis 1997; 24:1122-1128.
- BODEY GP. Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis, and treatment, 2ª ed. New York: Raven Press, 1993; pp 1-420.
- ESPINEL INGROF A, VÁZQUEZ JA, BOIKOV D, *et al*. Evaluation of DNA-based typing procedure for strain categorization of *Candida* spp. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33:231-239.
- HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, *et al*. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1999; 29:236-238.
- HEE SHIN J, 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.

- MEIS J, PETROU M, BILLE J, *et al.* A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. Global antifungal surveillance group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:215-223.
- MURIEL MA, VIZCAÍNO MJ, BILBAO R, *et al.* Identificación de levaduras y sensibilidad *in vitro* a diversos antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:120-124.
- ANÓNIMO. NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS Document M27-A . Vilanova:NCCLS, 1997; 17:16.
- ODDS F. *Candida* and candidosis. A review and bibliography, 2<sup>a</sup> ed. London: Bailliere Tindall, 1988; pp 7-15; 68-104.
- PELTROCHE-LLACSAHUANGA H, SCHNITZLER N, LÜTTICKEN R, HAASE G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalose-generated glucose. *J Clin Microbiol* 1999; 37:202-205
- SBALLS P, TORRES RODRÍGUEZ JM, SALVADÓ M, *et al.* La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio retrospectivo de nueve casos. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:2-5.
- TORRES-RODRÍGUEZ JM, MADRENYS N, JIMÉNEZ T, SBALLS P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test. *Rev Iberoam Micol* 1997;14 :115-118.