

## ***Candida lusitaniae***

**Carmina Lloret Sos, Olivia Gutiérrez Urbón y Nuria Borrell Solé**

**Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca**

*Candida lusitaniae* está siendo reconocida como un patógeno nosocomial emergente en los pacientes graves e inmunodeprimidos, por lo general de pronóstico fatal, si bien el aislamiento de esta levadura en la práctica clínica es, por fortuna, muy infrecuente. Se ha descrito como causa de casos fatales de infecciones sistémicas. A pesar de lo infrecuente, su interés clínico radica en su capacidad para desarrollar resistencia a la anfotericina B, fundamentalmente en el contexto de tratamiento con este fármaco.

La especie *C. lusitaniae* fue descrita originalmente como *Candida obtusa* *Candida parapsilosis* var. *obtusa* y se aisló por primera vez en 1959, por Van Under y Do Carmo-Sousa, como microorganismo perteneciente a la flora intestinal en los animales de sangre calientes. Posteriormente, Pappagianis *et al* y Holschu *et al* describieron los primeros casos de infección humana oportunista en un pacientes con leucemia aguda, a la vez que demostraron la mencionada capacidad para seleccionar mutantes resistentes a la anfotericina en el curso del tratamiento. Poco tiempo después, otros autores publicaron los primeros casos de aislamiento de la levadura en la sangre.

Microscópicamente, *C. lusitaniae* está constituida por células gemantes de forma elipsoidal. No forma hifas ni, en consecuencia, presenta tubo germinal, aunque es frecuente observar la formación de pseudomicelio. En los medios de cultivo habituales, las colonias son de color y aspecto cremoso, deslizantes, blandas y suaves. El teleomorfo es *Clavispora lusitaniae*. Desde el punto de vista bioquímico, la especie se reconoce por la asimilación de sorbosa, ramnosa y 2-ceto-D-gluconato; no reduce los nitratos ni crece en ausencia de piridoxina

### **ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS**

*Candida lusitaniae* afecta primordialmente a los pacientes con enfermedades graves e inmunodeprimidos. La incidencia como patógeno es baja, alcanzándose frecuencias del 1-2% en las candidosis de origen nosocomial. Sin embargo, algunos autores, como Sánchez *et al.*, han descrito porcentajes hasta de un 7% de colonización en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea o ingresados en unidades de cuidados intensivos. Como consecuencia de la publicación de éste y de otros trabajos similares, existe una controversia, por ahora no resuelta, sobre el incremento en la frecuencia de aislamiento de esta levadura. Es posible, sin embargo, que el fenómeno sea debido a una mayor atención prestada por los laboratorios como consecuencia de las características de resistencia a la anfotericina, aunque también podría atribuirse al aumento de la población de pacientes inmunodeprimidos, lo que lleva consigo una mayor utilización de este antifúngico.

Al margen de la frecuencia real de las infecciones por *C. lusitaniae*, esta levadura se ha implicado en casos de sepsis, meningitis, pielonefritis, osteomielitis e infecciones del tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal. Como ya se ha mencionado, las infecciones suelen producirse en pacientes debilitados. Por lo tanto, *C. lusitaniae* comparte con otras especies del género los factores de riesgo para la colonización y, eventualmente, para producir infecciones. Así, además de la neutropenia profunda y prolongada, el uso de catéteres endovenosos, la corticoterapia, quimioterapia y el tratamiento con antibióticos, sobre todo de amplio espectro, constituyen los factores desencadenantes de las infecciones por esta levadura.

Se admite, por lo general, que el origen de las infecciones por *C. lusitaniae* es endógeno, si bien han aparecido recientemente trabajos que involucran a esta levadura en contagios persona a persona y en un posible origen ambiental de algunas infecciones. Por ejemplo, estudios de tipificación con técnicas moleculares, como el análisis de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción, sugieren un origen clonal común en pequeños brotes detectados en unidades de cuidados intensivos neonatales y de adultos, presumiblemente exógeno. A este hecho hay que añadir trabajos que ponen de manifiesto el aislamiento de *C. lusitaniae* en objetos inanimados, como harinas, cáscaras de frutos cítricos, leche de vaca, etc.

## **RESISTENCIA A LA ANFOTERICINA B EN *Candida lusitaniae***

Como ya se ha mencionado, la capacidad para desarrollar resistencia a la anfotericina B constituye la característica más importante de *C. lusitaniae* desde el punto de vista clínico. La resistencia a la anfotericina B en *C. lusitaniae* es, mayoritariamente, adquirida, aunque existen algunas descripciones de cepas con resistencia intrínseca. Esta levadura es normalmente sensible a este antifúngico, si bien diversos estudios han descrito el desarrollo de cepas resistentes en los pacientes tratado con este fármaco. Asimismo, algunos trabajos *in vitro* han demostrado la rápida selección de la resistencia entre las cepas sensibles expuestas a la anfotericina. Esta circunstancia ha llevado a suponer que la utilización cada vez más frecuente de la anfotericina, tanto por la mayor frecuencia relativa de pacientes con infección fúngica, como de la disponibilidad de presentaciones menos nefrotóxicas (formulaciones lipídicas de anfotericina) podría constituir un factor de riesgo para un aumento progresivo en la incidencia de cepas de *C. lusitaniae* resistentes a esta droga pero, por el momento, no existen elementos convincentes que permitan corroborar esta hipótesis.

Por lo que se refiere al mecanismo de resistencia, de forma similar a otras especies de *Candida*, ésta es debida a cambios en la composición del ergosterol de la membrana celular de la levadura, asociada a un defecto en el gen *erg 2* que induciría un acúmulo de otros esteroides sobre los que la anfotericina no es capaz de actuar. Otros factores a tener en cuenta son la disminución en la síntesis total de ergosterol, de la actividad catalásica y a cambios en fosfolípidos de membrana

## **PRUEBAS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS Y TRATAMIENTO**

De acuerdo con el documento del NCCLS M-27A, el método de referencia para valorar las CMI de los antifúngicos en *C. lusitaniae* es la técnica de macrodilución. Sin embargo, se están publicando actualmente estudios que evalúan métodos alternativos más adaptables al trabajo habitual de los laboratorios clínicos. Así, en un estudio que comparaba el método E-test® con la macrodilución, se concluyó que la técnica alternativa resultaba más sencilla de realizar, la lectura de las CMI más fácil, y los resultados obtenidos equiparables al método de referencia. Además, el sistema E-test® permitió observar el desarrollo de colonias heterorresistentes.

De acuerdo con otros estudios recientemente publicados, la adquisición de resistencia a la anfotericina se relacionaría con variaciones fenotípicas que se traducirían en cambios morfológicos de las colonias. Por ejemplo, en el trabajo de McClenny *et al*, las colonias de resistentes aisladas en el transcurso del tratamiento prolongado con anfotericina mostraban una coloración púrpura en el medio CHROMagar® claramente diferente del azul que presentaban las cepas que eran sensibles a la droga (azul), idénticas a su vez a las cepas originalmente sensibles antes de iniciar la administración del antifúngico. Este fenómeno también se ha observado en experimentos de selección de resistencia *in vitro*.

Dada la relativa escasa frecuencia del aislamiento de *C. lusitaniae* en la clínica, no se dispone de datos concluyentes sobre el tratamiento antifúngico. Sin embargo, dada la asociación con la aparición de cepas resistentes a la anfotericina, el tratamiento recomendado es el fluconazol, a dosis de 6-12 mg/kg/día. Puesto que los nuevos azoles muestran actividad *in vitro* frente a esta levadura, parece razonable asumir que puedan utilizarse para tratar la infecciones por *C. lusitaniae*.

## IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

Tradicionalmente, la identificación de *C. lusitaniae* y la de otras levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a criterios morfológicos y bioquímicos. Los criterios morfológicos (tabla 1) no consiguen establecer la diferenciación entre *C. lusitaniae* y las otras especies de su género, y sirven, fundamentalmente, como método de cribado primario.

**Tabla 1. Características morfológicas diferenciales de las especies de *Candida*<sup>a</sup>.**

Especie	Clamidosporas	Tubo germinal	Pseudohifas	Morfología colonial en CHROM-agar®
<i>C. lusitaniae</i>	–	–	Variable	Rosa, púrpura
<i>C. tropicalis</i>	±	–	+	Azul oscuro, gris-azulado
<i>C. albicans</i>	+	+	+	Azul-verde
<i>C. glabrata</i>	–	–	–	Blancas, rosadas
<i>C. krusei</i>	–	–	+/-	Rosa pálido, rugosas
<i>C. parapsilosis</i>	–	–	+	Blancas, rosa pálido
<i>C. dublinensis</i>	+	+	+	Verde oscuras
<i>C. guilliermondii</i>	–	–	Primitivas	Rosa pálido, púrpura

<sup>a</sup>Modificado de Calderone (ver bibliografía).

Respecto a las características de crecimiento en cultivo, la mayoría de las especies de *Candida*, y entre ellas *C. lusitaniae*, crecen fácilmente en los medios de cultivo habituales en el laboratorio de Microbiología (agar sangre, agar chocolate, etc.), aunque es el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos, el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras. En el agar de Sabouraud con gentamicina y cloranfenicol (SGC), *C. lusitaniae* produce unas colonias lisas, no adherentes, de color blanco o cremoso, de aspecto céreo, más o menos brillantes. Obviamente, estas características morfológicas no permiten la diferenciación de *C. lusitaniae* de la mayoría de otras especies de levaduras del mismo género, aunque deben tenerse en cuenta como dato orientador.

Tampoco la morfología colonial en los medios cromógenos, como el CHROM-agar®, *Candida* ID® y similares, nos permite por sí sola la identificación de esta especie, pero de nuevo puede aportar una información auxiliar importante, en especial para diferenciarla de la especie *C. tropicalis* que, como veremos más adelante, suele ser la que plantea con mayor frecuencia dificultades a la hora de la identificación final. En el medio CHROM-agar®, *C. lusitaniae* produce, a las 48 h, unas colonias rosas que tienden a oscurecerse conforme se prolonga el tiempo de incubación.

El examen microscópico, especialmente la prueba de filamentación precoz (tubo germinal) nos aportará también una información rápida y simple, siendo negativo en *C. lusitaniae*. La observación microscópica con tinciones (v.g., la tinción de Gram) permite observar la formación de pseudohifas con cadenas cortas de blastoconidias, producidas por *C. lusitaniae*.

Para conseguir la identificación final de *C. lusitaniae* de las otras especies del género, debemos recurrir a los criterios bioquímicos, que ponen de manifiesto reacciones enzimáticas y la fermentación o asimilación de distintos azúcares. De hecho, el crecimiento en los medios cromógenos, basado en la hidrólisis enzimática de ciertos substratos es, de por sí, un criterio bioquímico. Aunque pueden utilizarse métodos manuales, lo más frecuente es llevar a cabo la identificación bioquímica mediante sistemas comerciales, para lo que existe en el mercado un notable abanico de posibilidades. Así, por ejemplo, la galería Auxacolor® es un sistema basado en la asimilación de 13 azúcares y que permite diferenciar 26 especies diferentes de levaduras, entre las que se encuentra *C. lusitaniae*. Los sistemas semiautomáticos, tales como API 20 C AUX® y API ID 32C® suelen ser suficientemente discriminantes con la identificación de *C. lusitaniae* ya que su patrón bioquímico le diferencia claramente de otras especies del género *Candida*, aunque hay que señalar que no todas las galerías comerciales incluyen todos los azúcares clave para la diferenciación de *C. tropicalis*, como se expone a continuación. En la tabla 2 se indican las principales reacciones obtenidas con la especie *C. lusitaniae*.

**Tabla 2. Principales reacciones de identificación de *C. lusitaniae*.**

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Fermentación:		Asimilación:	
D-glucosa	+	Trealosa	+
D-galactosa	V	Celobiosa	+
Maltosa	-	Salicina	+
Sacarosa	-	Melibiosa	-
Asimilación:		Rafinosa	-
D-galactosa	V	Melecitosa	-
L-sorbosa	+	Glicerol	+
D-ribosa	+	Manitol	+
D-xilosa	+	Adonitol	+
L-arabinosa	-	Inositol	-
L-ramnosa	+	Sorbitol	
Sacarosa	+	Xilitol	V
Maltosa	+	N-acetil-glucosamina	+

### Diferenciación de *Candida tropicalis*

En la práctica diaria del laboratorio, el problema más importante se plantea a la hora de diferenciar *C. lusitaniae* de *C. tropicalis*. Morfológicamente, ambas son muy parecidas en los medios de cultivo habituales. Las dos especies producen colonias brillantes de color blanco cremoso y rápido crecimiento. Microscópicamente presentan blastoconidias a lo largo de las pseudohifas.

La utilización de medios cromogénicos puede ayudar a diferenciarlas, si bien hay que tener en cuenta que estos medios son costosos y no todos los laboratorios tienen acceso a ellos. La siembra de estas especies en estos medios origina colonias de color gris azulado para *C. tropicalis*. Por el contrario, *C. lusitaniae* muestra colonias de un color que varía entre rosa y púrpura, dependiendo del tiempo de incubación.

Ya se ha señalado anteriormente que algunos sistemas comerciales pueden ser insuficientes para diferenciar ambas especies, ya que no contienen los cuatro azúcares (glicerol, ramnosa, gluconato y sorbosa) cuya asimilación resulta clave para este fin (tabla 3). Por ejemplo, la galería API 20C sólo incluye el glicerol, mientras que el sistema API ID 32C contiene los cuatro. Como se desprende de la tabla 3, es conveniente analizar los resultados obtenidos con más de uno de estos sustratos, ya que la asimilación de un determinado azúcar puede variar según la cepa de que se trate. Por lo general, *C. lusitaniae*

asimila glicerol, ramnosa, gluconato, sorbosa y celobiosa, mientras que *C. tropicalis* no suele utilizar estos substratos azucarados

**Tabla 3. Reacciones de asimilación diferenciales<sup>a</sup> entre *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*.**

Especie	Glicerol	Ramnosa	Gluconato	Sorbosa	Celobiosa
<i>C. lusitaniae</i>	82	100	100	95	80
<i>C. tropicalis</i>	9	3	33	5	17

<sup>a</sup>Expresadas como porcentaje de reacciones positivas.

Por último, otra prueba que nos puede ayudar en la diferenciación de estas especies es el crecimiento en caldo Sabouraud, negativo para *C. lusitaniae*, mientras que *C. tropicalis* crece formando burbujas en la superficie del caldo.

## BIBLIOGRAFÍA

- CALDERONE RA. Taxonomy and biology of *Candida*. En: Calderone RA (ed). *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press, 2002; pp 15-27.
- DE HOOG GS, GUARRO J, TAN CS, WINTERMANS RGF, GENÉ J. Pathogenic fungi and common opportunists. En: De Hoog GS, Guarro J (eds). *Atlas of clinical fungi*. Baarn y Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures y Universitat Rovira i Virgili, 1995; pp 1-238.
- GUINET R, CHANAS J, GOULLIER A, BONNEFOY G, AMBROSE-THOMAS P. Fatal septicemia due to amphotericin-B-resistant *Candida lusitaniae*. *J Clin Microbiol* 1983; 18:443-444.
- HALDFIELD TM, SMITH MB, WINN RE, RINALDI MG, GUERRA C. Mycoses caused by *Candida lusitaniae*. *Rev Infect Dis* 1987; 9:1006-1012.
- HOLSCHU DL, PRESLEY HL, MIRANDA M, PHAFF HJ. Identification of *Candida lusitaniae* as an opportunistic yeast in humans. *J Clin Microbiol* 1979; 10:202-205.
- LINARES SICILIA MJ, SOLÍS CUESTA F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC (eds). *Guía práctica identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología /Asociación Española de Micología, 2001; pp 11.1-11.18.
- MCCLENNY NB, FEI H, BARON EJ *et al.* Change in colony morphology of *Candida lusitaniae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1325-1328.
- PAPPAGIANIS D, COLLINS MS, HECTOR R, REMINGTON J. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16:123-126.
- PEYRON F, FAVEL A, MICHEL-NGUYEN A, GILLY M, REGLI P, BOLMSTRÖM A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitaniae* by Etest. *J Clin Microbiol* 2001; 39:339-342.
- SÁNCHEZ V, VÁZQUEZ JA, BARTH-JONES D, DEMBRY L, SOBEL JD, ZERVOS MJ. Epidemiology of nosocomial acquisition of *Candida lusitaniae*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3005-3008.
- WARREN NG, HAZEN KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, 1999; pp 1184-1199.

YOON SA, VÁZQUEZ JA, STEFFAN PE, SOBEL JD, AKINS RA. High frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:836-845.