

Comunicación breve

Estandarización del medio de cultivo específico ACA para la identificación presuntiva de *Candida auris* aisladas en sangre

Maribel Dolande^{a*}, Aleiram Chaurio^a, Sofía Selgrad^a, Juan Frey^a, Andreina Duarte^b

^aDepartamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". ^bCátedra de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical, Escuela de Medicina "Luis Razetti", Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Recibido 02 de abril de 2024; aceptado 08 de junio de 2024

<https://doi.org/10.69833/RSVM.2024.1.44.06>

Resumen: *Candida auris* es una levadura emergente multirresistente a varias clases de antifúngicos. La identificación se realiza por técnicas moleculares o proteicas. Se han desarrollado medios específicos para aislar *C. auris* basados en su tolerancia a altas concentraciones de NaCl (≥ 10 %) y temperaturas ≥ 40 °C. Ibrahim A, *et al.*, modificaron y desarrollaron uno con especificidad del 100 % para todos los clados de *C. auris*. Esto nos motivó a reproducir su investigación. Se utilizaron 117 cepas conservadas en la micoteca del INHRR: *C. auris* (n=71), *Cryptococcus gattii* (n=1) y *Candida* NO *auris* (n=45). De estas últimas, 56,5 % y 26 % presentaron resistencia a fluconazol y voriconazol, respectivamente. Se elaboró el medio ACA con agar Sabouraud, NaCl, cristal violeta y cloranfenicol, se esterilizó a 120 °C x 15 min y se dispensó en placas de Petri. Las cepas fueron inoculadas e incubadas a 37 °C y 42 °C por 72 horas hasta la lectura final. De las 71 cepas de *C. auris* 69 (97,2 %) crecieron en ACA; las 46 cepas restantes no crecieron a 42 °C. El medio reformulado ACA fue capaz de detectar *C. auris*. Se sugiere implementar su uso en el laboratorio: es fácil, sencillo de preparar, económico, reproducible y confiable. La identificación definitiva de *C. auris* se realiza por biología molecular o MALDI-TOF MS.

Palabras clave: *Candida auris*, hongo emergente, identificación, medio selectivo, resistencia antifúngica.

Standardization of the specific ACA culture medium for the presumptive identification of *Candida auris* isolated in blood

Abstract: *Candida auris* is an emerging yeast with multi-resistance to several classes of antifungals. Identification is performed by molecular or protein techniques. Specific media have been developed to isolate *C. auris* based on its tolerance to both high ≥ 10 % NaCl concentrations and ≥ 40 °C temperatures. Ibrahim A, *et al.*, modified and developed one culture media with 100 % specificity for all *C. auris* clades. This motivated us to reproduce their research. One hundred and seven (117) strains conserved in the INHRR fungal culture collection were used: *C. auris* (n=71), *Cryptococcus gattii* (n=1) and non-*C. auris* (n=45). Of the latter, 56.5 % and 26 % were resistant to fluconazole and voriconazole, respectively. ACA medium was prepared with Sabouraud agar, NaCl, crystal violet and chloramphenicol, sterilized at 120 °C x 15 min and dispensed into Petri dishes. The strains were inoculated and incubated at 37 °C and 42 °C for 72 hours until the final reading. Of the 71 *C. auris* strains, 69 (97.2 %) grew in ACA; the remaining 46 strains did not grow at 42 °C. The reformulated ACA medium was able to detect *C. auris*. It is suggested to implement its use in the laboratory: it is easy, simple to prepare, economical, reproducible, and reliable. The definitive identification of *C. auris* is done by molecular biology or MALDI-TOF MS.

Key words: *Candida auris*, emerging fungus, identification, selective medium, antifungal resistance.

*Correspondencia:

E-mail: maribeldolande@gmail.com

ORCID: 0000-0002-4019-1310

Introducción

Candida auris es una levadura emergente, multiresistente a varias clases de antifúngicos como los azoles, la anfotericina B y las equinocandinas [1], que se asocia a una mortalidad significativa que oscila entre 30 - 70%, especialmente en pacientes inmunodeprimidos con múltiples comorbilidades como diabetes mellitus, insuficiencia renal y enfermedades cardiovasculares [2,3]. Así pues, su rápida identificación y caracterización son necesarios para optimizar los resultados clínicos e intentar contener su propagación nosocomial y mundial [3]. *C. auris* es una levadura formadora de biopelículas, halotolerante y termorresistente que puede crecer a temperaturas entre 30°C y 42°C, tolerando más de un 10 % de salinidad [4]. Esto favorece su capacidad para colonizar diversos equipos médicos, superficies de plástico y entornos nosocomiales, lo que la convierte en un potente patógeno invasivo [5].

La identificación de *C. auris* es un reto y requiere enfoques moleculares o proteicos, cuya disponibilidad es limitada en muchos laboratorios de microbiología en Venezuela [5,6], por lo que es necesario implementar un método para su detección e identificación presuntiva rápido, válido y confiable, que permita hacer vigilancia y tomar las medidas de prevención y control de este hongo, elementos que son esenciales para instaurar un tratamiento antifúngico oportuno y adecuado, con el fin de contribuir a la sobrevida del paciente y disminuir su propagación en los centros de salud [4,5].

Desde el primer informe en 2009 en Japón, la infección por *C. auris* se ha reportado en seis continentes [6,7]. Basándose en la secuenciación de su genoma completo, se ha clasificado en cuatro clados geográficos principales, a saber, clado I (Asia meridional), clado II (Asia oriental), clado III (Sudáfrica) y clado IV (Sudamérica), más un posible quinto clado en Irán [1].

Ibrahim A, et al., desarrollaron un medio de cultivo selectivo y específico para la identificación de todos los clados de *C. auris*. La especificidad del medio es del 100 %, confirmada mediante el ensayo de un conjunto de 135 cepas de *Candida*, 50 especies bacterianas y 200 muestras de heces humanas [1]. Este medio permite seleccionar específicamente el aislamiento de *C. auris* a partir de muestras clínicas, lo que posibilita estudiar su perfil fenotípico; por esta razón se realizó la investigación con cepas identificadas como *C. auris* en el laboratorio [8].

A pesar del alarmante aumento de informes sobre infecciones por *C. auris* en la última década, las cifras notificadas representan quizá una subestimación de la verdadera incidencia, ya que el hongo es difícil de identificar mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas convencionales [9]. Cuando surgió por primera vez *C. auris*, los laboratorios de microbiología clínica sólo podían identificarla mediante la secuenciación de su ADN. Durante la década siguiente a su primera identificación fuera de Japón, se han producido muchas mejoras en la

detección de *C. auris*. Entre ellas, se incluye la utilización de la espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), así como el desarrollo de pruebas de laboratorio y de kits comerciales para su detección, como el CHROMagar especial para la identificación a partir de muestras de laboratorio [8-10].

La identificación de *C. auris* es difícil. Las pruebas de identificación disponibles comercialmente, automatizadas o colorimétricas, como VITEK®, API20C-AUX®, Auxa-Color 2®, BD Phoenix® y MicroScan®, la identifican erróneamente con otras especies de *Candida* como *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. sake*, *C. lusitanae* y *C. guilliermondii*. Los medios cromogénicos, si bien ayudan, no son específicos para todas las especies de *Candida*, y la identificación es presuntiva [9-11].

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar y evaluar, por primera vez en Venezuela, el medio específico agar *Candida auris* (ACA) reformulado para la detección e identificación presuntiva de *C. auris* a partir de sangre (hemocultivos).

Materiales y métodos

Se evaluaron un total de 117 cepas conservadas en la micoteca del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR): *C. auris* (n=71), *Cryptococcus gattii* (n=1) y *Candida NO auris* (n=45), distribuidas de la siguiente forma: *C. parapsilosis* (n=12), *C. tropicalis* (n=9), *C. pelliculosa* (n=8), *C. glabrata* (n=7), *C. albicans* (n=4), *C. krusei* (n=2), *C. haemulonii var. vulnera* (n=2), *C. haemulonii* (n=1). Todas las cepas del género *Candida* se aislaron de sangre y *C. gattii* de líquido cefalorraquídeo (LCR). Entre las 45 cepas *Candida NO auris* se seleccionaron 56,5% con resistencia a fluconazol y 26% a voriconazol. Las 71 cepas de *C. auris* eran 100%, 95,8% y 21% resistentes a fluconazol, voriconazol y equinocandinas respectivamente, sin resistencia a anfotericina B [12].

Se preparó el agar selectivo desarrollado por Ibrahim A, et al., [1] con algunas modificaciones. Se utilizó como base el agar Sabouraud dextrosa, que contiene tres de los ingredientes del mencionado agar con la misma composición (5 g de digerido pancreático de caseína, 5 g de digerido péptido de tejido animal, 15 g de agar). Se agregaron 100 g de cloruro de sodio (NaCl), 0,5 g de cristal violeta y 50 mg/L (0,05 g) de cloranfenicol, ingredientes restantes del medio selectivo antes mencionado no contenidos en el agar Sabouraud, omitiendo 50 mg/L de gentamicina y los 20 g de manitol, debido a que el agar Sabouraud contiene 40 g de dextrosa como fuente de carbono. El medio se completó hasta 1 litro con agua destilada, se ajustó a pH 7,0, se esterilizó a 120°C por 15 minutos y se dispensó en placas de Petri. Esta modificación del medio original se denominó agar *Candida auris*

(ACA).

Las 117 cepas fueron sembradas directamente en el medio ACA por agotamiento y se incubaron a 37°C y 42°C por 72 horas hasta su lectura final. Los datos se analizaron con Microsoft Excel 2013 utilizando porcentajes.

Resultados y discusión

De 117 cepas empleadas en el estudio, 71 cepas de *C. auris* fueron previamente identificadas por MALDI-TOF MS, de las cuales 69 (97,2 %) crecieron en ACA y solo 2 (2,8 %) no crecieron. Las 46 cepas restantes de diversas especies de *Candida* y *Cryptococcus* no crecieron a 42°C durante las 72 horas de observación. Llamó la atención que 8 cepas de *C. parapsilosis*, 2 de *C. haemulonii* var. *vulnera* y 1 de *C. haemulonii* crecieron a 37°C a las 72 horas de incubación (Figura 1).

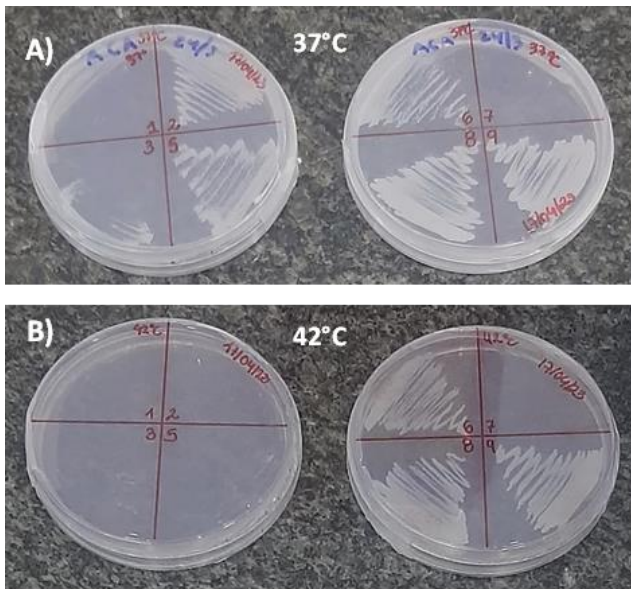


Figura 1. Agar *Candida auris* (ACA). A) Incubación a 37 °C a las 72 horas. Cepas ensayadas: 1. Complejo *C. albicans*; 2 y 5. Complejo *C. haemulonii*; 3. Complejo *C. parapsilosis*; 7. *C. tropicalis*; 6, 8 y 9 *C. auris*. B) Incubación a 42 °C a las 72 horas. Cepas: 1. Complejo *C. albicans*; 2 y 5. Complejo *C. haemulonii*; 3. Complejo *C. parapsilosis*; 7. *C. tropicalis*; 6, 8 y 9. *C. auris*.

El diagnóstico de *C. auris* es difícil y requiere de técnicas moleculares o de MALDI-TOF MS. Los medios de cultivo y los kits comerciales desarrollados hasta la fecha solo permiten la identificación presuntiva de *C. auris* [9,10]. Welsh RM, et al., desarrollaron un medio de cultivo líquido específico para el aislamiento de *C. auris*, sin embargo, algunos aislados de *Candida* seguían siendo identificados erróneamente [4]. Por lo que Ibrahim A, et al., realizaron modificaciones al medio creado por Welsh, obteniendo mejores resultados e incluso logrando la especificidad necesaria para aislar e identificar *C. auris* procedentes de los 4 clados descritos en las diferentes regiones de los 6 continentes; además, logró inhibir el

crecimiento de *C. tropicalis* totalmente con la adición al medio de cristal violeta [1].

Lógicamente, se requiere seguir ensayando un número mayor de distintas especies de *Candida*, tanto sensibles como resistentes a los antifúngicos, caracterizadas además por el patrón de oro que es la biología molecular, para correlacionar la especificidad y permanencia en el tiempo de *C. auris* [10].

Conclusiones y recomendaciones

El medio específico ACA reformulado fue capaz de detectar *C. auris* en un 97,2%; el resto de las levaduras evaluadas de diferentes especies de *Candida* y *Cryptococcus* no crecieron en el medio. La resistencia conocida a los distintos antifúngicos que presentaron las cepas evaluadas no interfirió con su crecimiento en el ACA.

Se sugiere implementar el uso del ACA junto a los medios de cultivo habituales (agar Sabouraud con antibiótico, agar cromogénico para *Candida*, Mycosel® o Dermasel® y agar harina de maíz) que se utilizan para el repique de hemocultivos en pacientes con candidemia, ya que permitiría el aislamiento rápido y específico de cepas de *C. auris*. Es una forma de vigilancia activa que ayudaría en la gestión oportuna de pacientes y recursos para limitar la aparición de brotes de *C. auris*.

Se propone la utilización del medio ACA en micología clínica para el cribado de muestras de piel, orina, vagina y sangre, especialmente en poblaciones de alto riesgo, para poder estimar las cifras reales de circulación y epidemiología de *C. auris* en los centros de salud de nuestro país.

El medio es sencillo y fácil de preparar, económico, reproducible y confiable, por lo que puede estar al alcance de todos los laboratorios de microbiología de rutina. Con su implementación se puede contribuir además a detectar nuevos aislados, para investigar y comprender las características fenotípicas de *C. auris* y de otras especies crípticas del género *Candida*, permitiendo además el estudio preciso de sus perfiles de resistencia a los antifúngicos.

La identificación definitiva de *C. auris* debe ser confirmada por biología molecular o MALDI-TOF MS, por lo tanto, los aislamientos deben ser enviados a un centro de referencia. Para más información se recomienda visitar la página web del Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas (NCEZID), División de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, el Agua y el Medioambiente (DFWED). Teléfono: 800-CDC-INFO (232-4636). Sitio web: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés.

Financiamiento

El estudio no recibió financiamiento.

Referencias

- Ibrahim A, Peyclit L, Abdallah R, Khelaifia S, Chamieh A, Rolain J.-M, Bittar F. SCA medium: a new culture medium for the isolation of all *Candida auris* clades. J Fungi. 2021; 7:433. DOI: [10.3390/jof7060433](https://doi.org/10.3390/jof7060433)
- Osei Sekyere, J. *Candida auris*: a systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. Microbiologyopen. 2018; 7:e00578. DOI: [10.1002/mbo3.578](https://doi.org/10.1002/mbo3.578)
- Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, Candida auris Incident Management Team, Manuel R, Brown CS. *Candida auris*: a review of the literature. Clin Microbiol Rev. 2018; 31:e00029-17. DOI: [10.1128/cmr.00029-17](https://doi.org/10.1128/cmr.00029-17)
- Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. J Clin Microbiol. 2017; 55:2996–3005. DOI: [10.1128/jcm.00921-17](https://doi.org/10.1128/jcm.00921-17)
- Kean R, Ramage G. Combined antifungal resistance and biofilm tolerance: the global threat of *Candida auris*. mSphere. 2019; 4:e00458-19. DOI: [10.1128/mSphere.00458-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00458-19)
- Calvo B, Melo AS, Perozo-Mena A, Hernández M, Francisco EC, Hagen F, et al. First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. J Infect. 2016; 73:369 – 74. DOI: [10.1016/j.jinf.2016.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.008)
- Lone SA, Ahmad A. *Candida auris* - the growing menace to global health. Mycoses. 2019; 62:620–37. DOI: [10.1111/myc.12904](https://doi.org/10.1111/myc.12904)
- Kean R, Brown J, Gulmez D, Ware A, Gordon Ramage. *Candida auris*: a decade of understanding of an enigmatic pathogenic yeast. J Fungi. 2020; 6:30. DOI: [10.3390/jof6010030](https://doi.org/10.3390/jof6010030)
- Das Singh S, Tawde Y, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Kaur H, Shankarnarayan SA, Ghosh A. A selective medium for isolation and detection of *Candida auris*, an emerging pathogen. J Clin Microbiol. 2021; 59:e00326-20. DOI: [10.1128/JCM.00326-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00326-20)
- Lockhart S, Lyman M, Sexton DJ. Tools for detecting a “Superbug”: updates on *Candida auris* testing. J Clin Microbiol. 2022; 60:1-9. DOI: [10.1128/jcm.00808-21](https://doi.org/10.1128/jcm.00808-21)
- Mulet Bayona JV, Salvador García C, Tormo Palop N, Valentín Martín A, González Padrón C, Colomina Rodríguez J, et al. Novel chromogenic medium CHROMagar™ *Candida* Plus for detection of *Candida auris* and other *Candida* species from surveillance and environmental samples: a multicenter study. J Fungi. 2022; 8:281. DOI: [10.3390/jof8030281](https://doi.org/10.3390/jof8030281)
- Dolande M, García N, Capote AM, Panizo M, Ferrara G, Alarcón V. *Candida auris*: antifungal multi-resistant emerging yeast. Curr Fungal Infect Rep. 2017; 11:197-202. DOI: [10.1007/s12281-017-0299-0](https://doi.org/10.1007/s12281-017-0299-0)



Este artículo está bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0