



Carta a los Directores

Identificación de levaduras aisladas de exudados vaginales de mujeres que asisten a centros de salud de León, Nicaragua



Identification of yeast clinical isolates in vaginal discharge from women attending public health clinics in León, Nicaragua

Señores directores:

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es causada por diferentes especies del género *Candida*¹. Hasta hace 3 décadas, el 70-90% de los casos se debían a *Candida albicans*, pero ha aumentado la frecuencia de CVV debida a otras especies del género². En Nicaragua se desconoce la magnitud del aumento de estas especies. El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Candida* aisladas de exudados vaginales en una población de mujeres que acudieron a 2 centros de salud de la ciudad de León y determinar la utilidad del Brilliance® *Candida* Agar.

Se tomaron muestras de 185 exudados vaginales que se procesaron por examen microscópico al fresco y cultivo en Sabouraud. Los aislamientos de levaduras obtenidos se subcultivaron en Brilliance® *Candida* Agar (Oxoid, Reino Unido) a 37 °C para una identificación presuntiva. La identificación morfológica se hizo mediante cultivo en Agar harina de maíz + Tween 80, según el método de Dalmau. Se realizó un cultivo en Sabouraud a 45 °C para diferenciar *C. albicans* de *Candida dubliniensis*.

De las 185 mujeres estudiadas, en 69 (37,3%) se aisló alguna especie de levadura. Se identificaron 6 especies, con *Candida glabrata* como la más frecuente (40,6%), seguida de *C. albicans* (36,2%) (tabla 1). En la distribución de especies de levaduras por grupo de edad, *C. albicans* fue más frecuente en las mujeres jóvenes y de mediana edad, mientras que *C. glabrata* predominó en el grupo de mayor edad (fig. 1).

De las especies de levaduras identificadas, *C. glabrata* superó en frecuencia a *C. albicans*, lo que elevó al 64% la proporción de especies de *Candida* diferentes de *C. albicans*. Esto es inusual en comparación con lo publicado en otros trabajos³⁻⁵. Solo en México se ha descrito una frecuencia del 61% de especies de *Candida* no-*C. albicans*, pero con un 35,9% de *C. glabrata*.

Con respecto a otras especies, *Candida krusei* se encontró en nuestro estudio dentro del rango del 1,5 al 4% descritos en Brasil y México^{6,7}, mientras que *Candida parapsilosis* tuvo mayor frecuencia que el 1,1 al 5,3% reportado en Latinoamérica^{5,6}. La frecuencia de *Candida tropicalis* resultó inferior al 8,5-23% reportado en la misma región^{4,6,7}.

El medio Brilliance® *Candida* Agar permitió la diferenciación de *C. albicans* del resto de especies y la identificación presuntiva de *C. tropicalis* y *C. krusei*, pero no permitió diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, ni *C. parapsilosis* de *C. glabrata*. Para la diferenciación

Tabla 1

Frecuencia de las especies de levaduras aisladas en los exudados vaginales de 185 mujeres que asistieron a consulta en 2 centros de salud de la ciudad de León

Especie	Frecuencia (n)	Porcentaje
<i>Candida glabrata</i>	28	40,6
<i>Candida albicans</i>	25	36,2
<i>Candida parapsilosis</i>	10	14,5
<i>Candida tropicalis</i>	3	4,3
<i>Candida krusei</i>	2	2,9
<i>Trichosporon asahii</i>	1	1,4

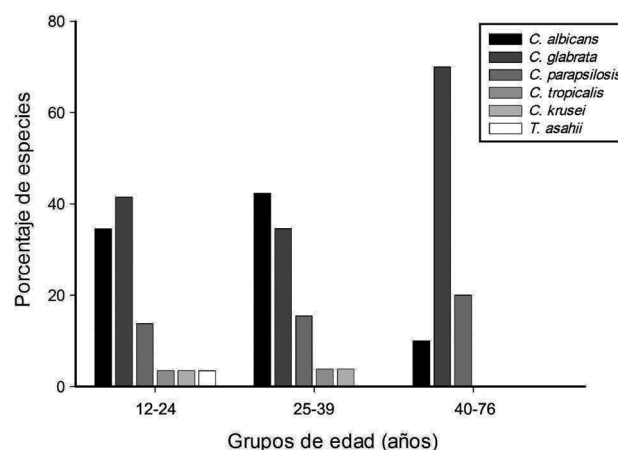


Figura 1. Distribución de especies de levaduras aisladas según el grupo de edad de las pacientes.

micromorfológica de estas últimas especies resultó útil el cultivo en Agar harina de maíz + Tween 80, según el método de Dalmau.

En conclusión, los hallazgos de nuestro estudio muestran que las especies de *Candida* no-*C. albicans*, y en particular *C. glabrata*, han alcanzado frecuencias elevadas en la población estudiada, lo que constituye una situación alarmante si consideramos que esta última especie es generalmente resistente a casi todos los azoles disponibles. En cuanto al Brilliance® *Candida* Agar, podemos decir que es un medio útil para la identificación presuntiva de levaduras en muestras clínicas, de fácil preparación y económicamente asequible.

Bibliografía

- Ahmad A, Khan A. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol.* 2009;144:68–71.

2. Andrioli J, Andrade C, Souza C, Lima Z, Haun M, Cazorla I, et al. Frequency of yeast in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31:300–4.

3. Darce M, González A, Barnabe C, Larrouy G. First characterization of *Candida albicans* by random amplified polymorphic DNA method in Nicaragua and comparison of the diagnosis methods for vaginal candidiasis in Nicaraguan women. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;97:985–9.

4. García M, García S, Copolillo E, Cora M, Barata A, Vay C, et al. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38:9–12.

5. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. *Crit Rev Microbiol.* 2011;37:250–61.

6. Rivera R, Flores R, Arriaga M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:634–6.

7. Sobel J. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369:1961–71.

Rosa Moreno y William Morales*

Departamento de Microbiología, Escuela de Bioanálisis Clínico, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: williamwmorales@gmail.com (W. Morales).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.006>
1130-1406/
© 2016 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Rapid detection of *Cryptococcus gattii* sensu lato using gold nanoparticles

Detección rápida de *Cryptococcus gattii* sensu lato mediante nanopartículas de oro

Dear Editor,

Successful treatment of cryptococcosis requires rapid, accurate identification of *Cryptococcus neoformans* or the *Cryptococcus gattii* species complex in addition to their discrimination from other pathogenic yeast species. Gold nanoparticles (AuNPs) have enabled improvements in biomedical sciences owing to their versatile properties and capacity for detecting biological molecules at low concentrations; these methods are inexpensive, rapid, and stable.^{1,2,6–9} We describe the application of AuNPs for detecting *C. gattii* sensu lato.

Our protocol was approved by the Animal Research Ethics Committees (23108.014032/14-0) and Research Ethics Committees of Hospital Universitário Júlio Muller (888/CEP-HUJM/2010). Twenty-one clinical *C. gattii* sensu lato isolates and four *C. neoformans* sensu lato isolates from humans and animals were tested. DNA was extracted using the glass bead method³ and samples representing each of the eight major molecular types of the *C. neoformans/gattii* species complex were used (Table 1). DNA samples from non-*Cryptococcus* microorganisms served as controls (Table 1).

AuNPs were synthesized using the citrate reduction method.^{4,5} Briefly, 250 ml of 1 mM gold chloride was boiled and added to 25 ml of 38.8 mM sodium citrate. For the hybridization test, we used probes based on the superoxide dismutase (*SOD1*) gene of *C. gattii* sensu lato (*SOD1*CGF 5’GATCCTCACGCCATTACG3’ and *SOD1*CGR 5’GAATGATGCGCTTAGTTGGA3’). First, 50 ng of sample DNA was denatured at 95 °C for 3 min in a mixture containing

1.25 M NaCl, 20 mM Tris–HCl, and 20 pmol oligonucleotides, followed by annealing at 50 °C for 2 min for hybridization and holding at 4 °C. This was followed by addition of 50 µl of the prepared AuNPs. Absorption (OD₃₀₀–OD₈₀₀) was measured using the BioTek® spectrophotometer (Winooski, VT, USA). The cutoff point was determined using the average absorbance values minus two standard deviations of five control samples without target DNA.

All reference samples were identified as *C. gattii* sensu lato, and a color change from red to purple indicated a positive reaction. Moreover, five non-*Cryptococcus* species and four *C. neoformans*

Table 1
Reference strains representing each of the eight major molecular types of the *Cryptococcus neoformans/gattii* complex, identified using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), and non-*Cryptococcus* strains.

Reference strain/isolate	Genotype
<i>C. neoformans</i> sensu lato (WM148)	AFLP1/VNI
<i>C. neoformans</i> sensu lato (WM626)	AFLP1B/VNII
<i>C. neoformans</i> sensu lato (WM628)	AFLP3/VNIII
<i>C. neoformans</i> sensu lato (WM629)	AFLP3/VNIV
<i>C. gattii</i> sensu lato (WM179)	AFLP4/VGI
<i>C. gattii</i> sensu lato (WM178)	AFLP6/VGII
<i>C. gattii</i> sensu lato (WM161)	AFLP5/VGIII
<i>C. gattii</i> sensu lato (WM779)	AFLP7/VGIV
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 204305)	NA ^a
<i>Pichia pastoris</i> (GS115)	NA ^a
<i>Conidiobolus lamprauges</i> ^b (INCQS 40316)	NA ^a
<i>Malassezia pachydermatis</i> ^b	NA ^a
<i>Pythium insidiosum</i> ^c (CBS 101555)	NA ^a

^a Not available.
^b Internal transcribed spacer (ITS) sequenced.
^c Stramenopila.

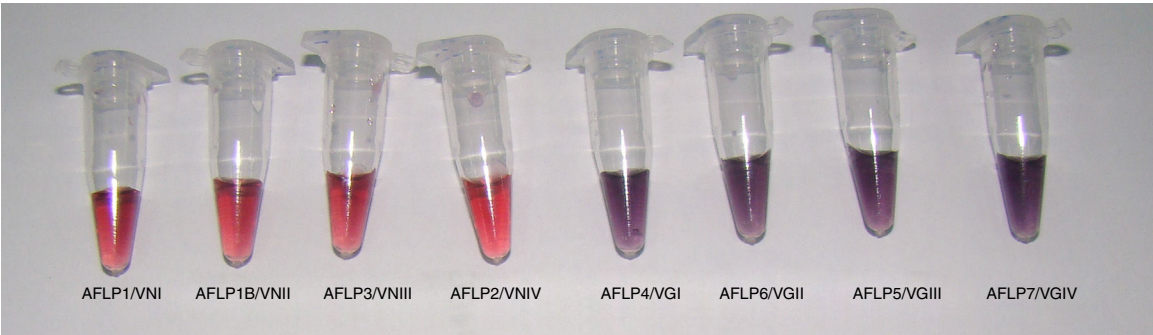


Figure 1. AuNPs test for detecting *C. gattii* based on the *sod* gene. VNI to VNIV: reference strains of *C. neoformans*; VGI to VGIV: reference strains of *C. gattii*. The reddish colour indicates a negative result, the purple one a positive result.