

Culturile mixte: o nouă perspectivă în diagnosticul și tratamentul candidozei orale – studiu epidemiologic

SILVIU ALECU^{*}1, SILVIA DUMITRIU¹

(1) *Catedra de Microbiologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București*

Primit (Received): 03.07.2007 / Acceptat (Accepted) : 31.08.2007

Mixed cultures: a new perspective in diagnosis and therapy of oral candidosis – epidemiological study

Abstract: *Aim.* To prospect for mixed cultures of *Candida* spp. in oral samples and to assess their antifungal susceptibilities with respect to a possible relapse of infection due to proliferation of the coexistent species usually not considered in routine laboratory practice. *Material and method.* 53 oropharyngeal samples were included in the study. For isolation and identification, the colony appearance on Chromagar Candida medium (Becton Dickinson, USA), chlamidospores production and substrate assimilation profiles based on API 20 C Aux system were used. The antifungal susceptibility was assessed using Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden) for fluconazole and ATB Fungus (bioMérieux, France) for nistatine, miconazole, econazole, ketoconazole, amphotericine B and 5-flucytosine. *Results.* 8 from 53 samples (15%) represented mixed cultures (4 double and 4 triple). Colonies numbering on primary isolation plate was used to consider the species causing the infection and the coexisting species as well. In these samples the dominant species were *Candida albicans* in 7 cases and *Candida glabrata* in 1 case. The coexistent species (*C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. lusitaniae*) were more resistant to antifungal agents than the main species *C. albicans*. By chance, in one sample, two different strains of *C. albicans* were identified by means of susceptibility patterns to antifungals. *Discussions.* Two or more *Candida* isolates with major susceptibility differences, could coexist in one sample. Species of *Candida* less susceptible could be easily selected after antifungal treatment if the coexisting species is not considered. The use of chromogenic media could be the key for the management of oral candidosis.

Keywords: oral candidosis, chromogenic media, yeasts mixtures, *Candida non albicans*

Rezumat: *Scop.* Decelarea simultană a mai multor specii de *Candida* în aceeași probă orofaringiană și stabilirea sensibilității lor la antifungice, în funcție de care se poate anticipa posibilă reapariție a semnelor clinice după tratamentul inițial, prin selectarea speciei mai rezistente care nu este luată în calcul în practica uzuală din laboratorul de microbiologie. *Material și metodă.* În acest studiu au fost incluse 53 de probe de origine orofaringiană. Izolarea și identificarea tulpinilor s-a făcut pe baza aspectului de creștere pe mediul Chromagar Candida, a producerii de clamidospori și a kitului comercial de identificare biochimică API 20 C Aux. Sensibilitatea la fluconazol a fost testată prin metoda Etest (AB Biodisk, Suedia), iar pentru nistatin, miconazol, econazol, ketoconazol, 5-flucitozină și amfotericină B s-a folosit kit-ul comercial ATB Fungus (bioMérieux, France). *Rezultate.* Din 53 de probe, 8 (15,1%) au fost mixte : 4 duble și 4 triple. În 7 cazuri specia dominantă a fost *Candida albicans*, iar într-unul *Candida glabrata*. Într-una dintre probe s-au depistat, pe baza sensibilității diferite la antifungice, 2 tulpini de *Candida albicans*. Speciile coexistente izolate (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*) au fost mult mai rezistente la antifungice comparativ cu specia majoritară. *Discuții.* Existența amestecurilor de levuri în probele orofaringiene (15,1%) reprezintă o certitudine cu consecințe în eficiența tratamentului. În plus, s-a stabilit existența simultană în aceeași probă a două tulpini de

^{*} Dr. Silviu Alecu, Dimitrie Gerota 19-21, 020027 București, Romania, e-mail: silviu_alecu@yahoo.com

Candida albicans. Utilizarea mediilor cromogene pentru izolarea primară reprezintă soluția pentru sesizarea speciilor de *Candida* asociate.

Cuvinte cheie: candidoza orală, medii cromogene, amestec de levuri, *Candida non albicans*

Introducere

Prin acest studiu ne-am propus să aflăm dacă există amestecuri de specii de *Candida* în aceeași probă orofaringiană, și dacă da, cât de frecvent este acest fenomen cu consecințe directe asupra eficienței tratamentului.

În legătură cu prezența amestecurilor de levuri în același specimen recoltat de la un pacient cu semne clinice de candidoză orală, în literatura de specialitate publicată înainte de începutul acestei cercetări existau două răspunsuri. Butz-Jorgensen (1) și Kreher (2) au raportat existența unor populații mixte de levuri, deci izolarea a mai mult de o specie de levuri, la un număr mare de pacienți cu stomatită de proteză. De asemenea, Coleman (3) împărtășește această părere, mai mult chiar avansează ideea existenței a mai multor tulpini din aceeași specie într-un produs patologic din sfera orală. Alți autori, cum este Cumming (4) raportează izolarea unei singure specii de la un singur pacient.

Dacă răspunsul la această întrebare este da, sunt evidente implicațiile de ordin terapeutic ce pot surveni în cazul nesesizării unui amestec de specii cu sensibilitate diferită la antifungice. De asemenea, creșterea incidenței infecțiilor fungice cu specii de *Candida non-albicans* mai rezistente la antifungicele mai frecvent utilizate, poate fi foarte bine explicată.

Soluția tehnică pentru îndeplinirea obiectivelor, constă în utilizarea mediilor cromogene pentru izolarea primară a levurilor (5,6). Astfel, în ciuda creșterii costurilor diagnosticului, se scurtează timpul necesar pentru identificare, făcută pe baza pigmentării diferite a coloniilor, aspect practic cu implicații directe în ghidarea tratamentului, profilul sensibilității la antifungice fiind corelat de multe ori cu specia de *Candida* (7).

Material și metodă

Un total de 53 de probe orofaringiene recoltate de la pacienți cu semne clinice de infecție candidozică orofaringiană, au fost incluse în acest studiu derulat în perioada 2000-2001; statusul clinic al pacienților nu a fost corelat cu rezultatele de laborator. Pentru izolarea primară a levurilor din produsele patologice recoltate de la pacienți, s-a optat pentru folosirea mediului diferențial și selectiv

CHROMagar *Candida* (CMA), un produs Becton Dickinson. Proprietățile mediului CMA permit creșterea selectivă a fungilor prin conținutul în cloramfenicol și identificarea speciilor cu importanță clinică pe baza pigmentării diferite a coloniilor, precum și recunoașterea amestecurilor de levuri într-un produs. Această metodă de izolare permite astfel evidențierea speciilor ce pot scăpa metodelor de diagnostic uzuale.

Produsele patologice au fost însămânțate direct pe plăcile CMA aduse la temperatura camerei și au fost incubate la 37°C și interpretate atât la 24, cât și la 48 ore. Interpretarea creșterii pe mediul CMA după o perioadă de incubare de 48 de ore la 37°C, nu ridică probleme deosebite, după o minimă perioadă de acomodare.

Identificarea tulpinilor izolate inițial pe mediul CMA a fost făcută pe baza criteriilor morfologice (8-16): aspectul, culoarea coloniilor pe mediul CHROMagar *Candida*, producerea de hife și clamidospori pe mediul Rice Agar Tween – RAT (bioMérieux, France).

Pentru stimularea formării de hife și clamidospori a fost folosită tehnica Dalmau de însămânțare a tulpinii izolate pe RAT (rice agar tween / orez agar tween) și prin folosirea testelor biochimice grupate de kit-ul comercial API 20 C AUX (bioMérieux) respectând recomandările producătorului.

Sensibilitatea tulpinilor de *Candida* izolate a fost testată calitativ față de nistatin, miconazol, econazol, ketoconazol, și cantitativ față de flucitozină, amfotericină B, folosindu-se kit-ul comercial ATB Fungus (bioMérieux, France), iar sensibilitatea la fluconazol a fost testată prin metoda Etest (AB Biodisk, Suedia) pentru stabilirea concentrației minime inhibitorii. Pentru testarea sensibilității la antifungice prin metoda Etest, a fost folosit mediul recomandat de producător, RPMI 1640 suplimentat cu 2% glucoză și 15 g/l agar (17).

Rezultate

Dintre cele 53 de probe orofaringiene recoltate, 45 (84,9%) au fost culturi simple, adică cu o singură tulpină izolată și 8 (15,1%) au fost culturi mixte (figura 1), cu observarea unui amestec de specii de *Candida*.

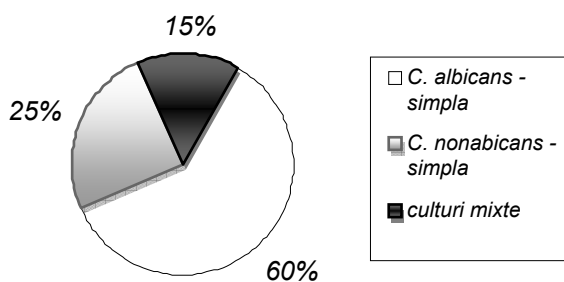


Figura nr. 1 Compoziția probelor, observată pe mediul Chromagar Candida

Dintre cele 45 de probe la care a fost izolată o singură tulpină, 32 (60,3%) au fost culturi simple de *Candida albicans*, iar 13 (24,5%) au fost culturi simple ale altor specii decât *C. albicans*, numite generic *Candida non-albicans*.

Dintre cele 8 culturi mixte, 4 au fost duble și 4 au fost triple, ceea ce înseamnă că au fost izolate câte 2, respectiv 3 tulpini diferite de *Candida* din aceeași probă. În 7 cazuri, specia dominantă a fost *Candida albicans*, iar într-unul *Candida glabrata*.

Într-unul din cele 4 cazuri de cultură dublă, au fost izolate 2 tulpini diferite aparținând aceleiași specii: *Candida albicans*. Observația a fost făcută pe baza profilului diferit de sensibilitate la antifungice (18).

Discuții

În cadrul acestui studiu au fost decelate amestecuri de *Candida spp.* în 15,1% dintre probe, adică în 8 din cele 53 de probe analizate. Mai mult, putem spune că amestecul a constat chiar și în coexistența a 3 specii distincte de *Candida* în 4 probe (figura 2).

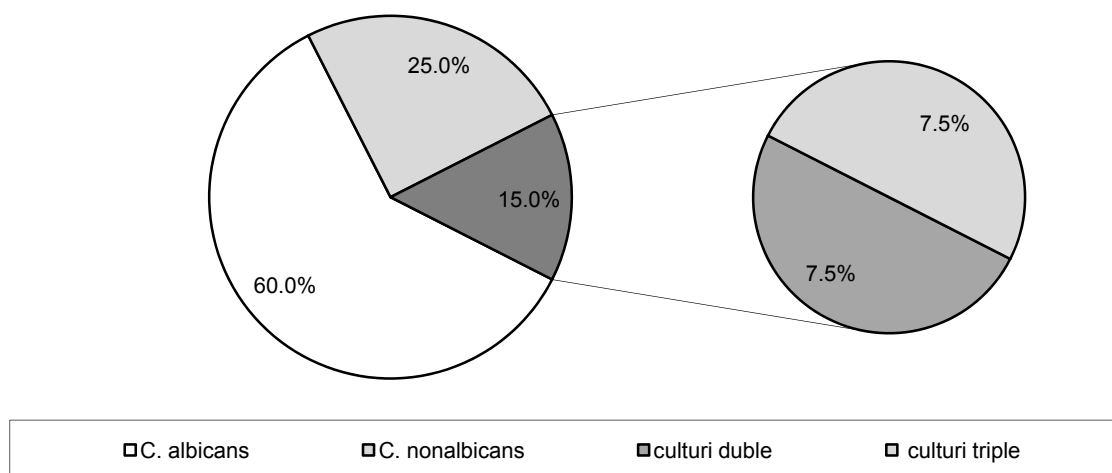


Figura nr. 2 Conținutul levuric al celor 53 probe orofaringiene

În toate cele 8 probe mixte, *Candida albicans* a fost prezentă în asociere cu încă una sau două specii de *Candida non-albicans*. Tulpinile de *Candida* asociate au aparținut speciilor *C. dubli-*

niensis, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae* și *C. norvegensis* (tabelul 1).

Tabelul 1

Specii izolate din cele 8 mixte

Specii de <i>Candida</i> izolate	Compoziția celor 8 probe cu amestec de levuri							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Candida albicans</i>	X	X	X	X	X	X	X	X/X
<i>C. dubliniensis</i>		X						
<i>C.kefyr</i>						X	X	
<i>C. krusei</i>	X			X	X			
<i>C. glabrata</i>			X			X		
<i>C. inconspicua</i>				X				
<i>C. lusitaniae</i>							X	
<i>C. norvegensis</i>					X			

O observație importantă este aceea că într-unul din cazuri au fost izolate două tulpini de *Candida albicans*, fapt ce este anticipat și de ipoteza enunțată de alți cercetători (3). Sesizarea acestui aspect nu a fost anticipată și reprezintă un rezultat suplimentar față de obiectivele propuse inițial, deoarece nu a existat nici un criteriu prestabilit pentru a deosebi două tulpini ale aceleași

specii în același produs patologic. Decelarea amestecului s-a bazat pe profilul diferit al sensibilității la 7 antifungice testate (tabelul 2), a culturilor obținute prin repicarea întâmplătoare a două colonii distincte dezvoltate în placa Petri de izolare primară, care aveau aceleași caractere fenotipice (18).

Tabelul 2

Sensibilitatea la antifungice a două tulpini de *C. albicans* izolate din aceeași probă (NIS-nistatin, MIC-miconazol, ECO-econazol, KET-ketoconazol, 5FC- 5 flucitozină, AMB-amfotericină B, FL-fluconazol; S-sensibil; I-intermediar sensibil; R-rezistent, careurile gri marchează situațiile în care tulpinile prezintă sensibilitate diferită la antifungice)

Caz	tulpina ID	specia	NIS	MIC	ECO	KET	concentrație minimă inhibitoare (mg/l)		
							5FL	AMB	FL
3	108A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.125
	108B	<i>C.albicans</i>	R	I	R	S	8	4	16

O altă observație interesantă, bazată pe numărul coloniilor cu aspect diferit, este aceea că și altă specie de *Candida*, în acest caz *Candida glabrata*, poate reprezenta specia dominantă în asociere cu *Candida albicans*, care astfel joacă un rol secundar. Despre tulpina de *Candida dubliniensis* izolată în acest studiu din 2000, se poate spune că este una din primele izolate pe baza unor criterii de diagnostic recomandate de literatura internațională (10,13,15), fapt comunicat încă din

2001 la ediția a XI-a a Congresului European de Microbiologie Clinica și Boli Infecțioase de la Istanbul (19).

După cum se observă în tabelul de mai jos (tabelul 3) sensibilitatea la agenți antifungici a tulpinilor dintr-un amestec este foarte diferită. Administrarea empirică a unui tratament antifungic poate conduce cu ușurință la selectarea speciei/speciilor mai puțin sensibile.

Tabelul 3

Evaluarea posibilului eșec terapeutic în cele 8 cazuri de amestec de specii levurice (NIS-nistatin, MIC-miconazol, ECO-econazol, KET-ketoconazol, 5FC- 5 flucitozina, AMB-amfotericina B, FL-fluconazol; S-sensibil; I-intermediar sensibil; R-rezistent, careurile gri marchează situația în care tulpinile prezintă sensibilitate diferită la antifungice, cu bold valorile CMI cu semnificație de rezistență)

Caz	tulpina ID	specia	NIS	MIC	ECO	KET	concentratie minima inhibitoare (mg/l)		
							5FC	AMB	FL
1	103A	<i>C.glabrata</i>	S	S	S	S	0.25	4	8
	103B	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.5
2	106A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.19
	106B	<i>C.krusei</i>	I	I	R	R	8	4	32
	106C	<i>C.norvegensis</i>	I	I	R	S	8	2	16
3	108A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.125
	108B	<i>C.albicans</i>	R	I	R	S	8	4	16
4	112A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	1
	112B	<i>C.kefyr</i>	S	S	S	S	1	4	0.5
	112C	<i>C.glabrata</i>	R	S	S	S	0.25	2	8
5	113A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.19
	113B	<i>C.kefyr</i>	S	S	S	S	2 (I)	1	0.38
	113C	<i>C.lusitaniae</i>	R	S	S	S	128 (R)	8	0.25
6	1A	<i>C.krusei</i>	S	S	I	S	0.5	1	24
	1B	<i>C.albicans</i>	S	I	I	I	0.25	2	0.125
7	20A	<i>C.albicans</i>	S	S	I	I	0.25	1	0.125
	20B	<i>C.dublinsiensis</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.25
8	21A	<i>C.albicans</i>	S	S	S	S	0.25	1	0.125
	21B	<i>C.inconspicua</i>	S	S	S	S	0.5	1	4
	21C	<i>C.krusei</i>	R	S	S	S	8	2	32

Selectarea tulpinilor rezistente reprezintă principala consecință a tratării unui caz în care există un amestec de specii care a trecut neobservat.

Avantajul folosirii unui mediu cromogen pentru izolare constă tocmai în sesizarea amestecurilor de levuri în produsele recoltate de la pacienți, cu evitarea selectării unei specii rezistente. În câmpurile gri ale tabelului, sunt semnalizate situațiile în care există diferențe de sensibilitate la un anumit antifungic.

Astfel, în situațiile acestor 8 probe mixte, având la dispoziție toate cele 7 antifungice incluse în studiu, și optându-se empiric pentru unul dintre ele fără a ști de existența unui amestec, șansele de “eșec terapeutic” sunt foarte mari, profilul sensibilității la antifungice fiind foarte variabil. Acest aspect are implicații nedorite în cazul culturilor mixte de levuri: selectarea tulpinii mai puțin sensibile, cu reapariția ulterioară a semnelor clinice.

Urmând acest scenariu, tulpinile selectate, ar fi unele sau toate dintre: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, specii cu sensibilitate redusă la antifungice sau chiar rezistente.

În concluzie, se pot contura două aspecte importante:

- Existența amestecurilor de levuri în probele orofaringiene (15,1%) reprezintă o certitudine ce nu trebuie neglijată. Ea are consecințe în eficiența tratamentului, cu repercusiuni epidemiologice prin selectarea tulpinilor rezistente. Utilizarea mediilor cromogene la izolarea primară se conturează ca necesitate pentru sesizarea speciilor de *Candida* asociate.

- Faptul că pot exista simultan două tulpini de *Candida albicans* în aceeași probă, are semnificații importante în ceea ce privește evoluția clinică a infecției.

Din perspectiva acestor două concluzii, eventualul eșec terapeutic își poate găsi încă o explicație – speciile / tulpinile “ascunse”. În același timp poate ilustra încă un mecanism de selecție a tulpinilor de *Candida non-albicans* aflate în plină creștere a incidenței.

Bibliografie

1. Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M - An epidemiological study of yeasts in elderly denture wearers; **Community Dentistry and Oral Epidemiology** 1975; 3:115-119.
2. Kreher J, Graser G N, Handelman S, Eisenberg A D - Oral yeasts, mucosal health, and drug use in an elderly denture-wearing population; **Special Care in Dentistry** 1991; 11:222-226.
3. Coleman D C *et al.* - Oral *Candida* in HIV Infection and Aids: New Perspective/New Approaches; **Critical Reviews in Microbiology** 1993; 19(2):61-82.
4. Cumming C G , Wight C, Blackwell C L, Wray D - Denture stomatitis in elderly; **Oral Microbiology and Immunology** 1990; 5:82-85.
5. Horvath L L *et al.* - Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*; **Journal of Clinical Microbiology** 2003; 41(6):2629-2632.
6. Odds F C, Bernaerts R - Chromagar *Candida*, a new Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species; **Journal of Clinical Microbiology** 1994; 32(8); 1923-1929.
7. Coleman D *et al.* - Importance of *Candida* species others than *C. albicans* as opportunistic pathogens; **Medical Mycology** 1998; Suppl. I 36.
8. Beighton D *et al.* - Use of CHROMagar *Candida* Medium for Isolation of Yeast from Dental Samples; **Journal of Clinical Microbiology** 1995; 33(11):3025-3027.
9. Tenea C, Defta C, Dumitriu S *et al.* – Actualități în diagnosticul de laborator al candidozei orale; **Revista Națională de Stomatologie** 1998; I (3):36-38.
10. Fricker – Hidalgo H *et al.* - Comparison of the new API *Candida* System to the ID 32C System for Identification of Clinically Important Yeast Species; **Journal of Clinical Microbiology** 1996; 34(7):1846-1848.
11. Heelan J S, Sotomayor E , Coon K, D’Arezzo B J - Comparison of the Rapid Yeast Plus Panel With The API20C Yeast System for Identification of Clinically Significant Isolates of *Candida* Species; **Journal of Clinical Microbiology** 1998; 36(5):1443-1445
12. MacFarlane T W, Samaranyake L P. **Clinical Oral Microbiology**; London : Wright, 1998.
13. Merlino J, Tambosis E , Veal D - Chromogenic Tube Test for Presumptive Identification or Confirmation of Isolates as *Candida albicans*; **Journal of Clinical Microbiology** 1998; 36(4):1157-1159.
14. Nestorescu I. **Bacteriologie Medicală**; București: Editura Medicală, 1961.
15. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I *et al.* - Simple, Inexpensive and Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*; **Journal of Clinical Microbiology** 1998; 36(7):2093-2095.
16. Rousselle P - Rapid Identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and Fluoroplate Agar Plates; **Journal of Clinical Microbiology** 1994; 32(12):3034-3036.
17. Rex J H, Rinaldi M G, Pfaller M A - Resistance of *Candida* species to fluconazole; **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1995; 39(1):1-8.
18. Alecu S, Defta C, Dumitriu S - Oral Candidosis, new perspective: mixtures of *Candida* spp. and antifungal therapy. **Clinical Microbiology and Infection** 2003; 9 (Suppl. 1):218.
19. Alecu S, Defta C, Dumitriu S - *Candida dubliniensis* found in a prospective study in Romania. **Clinical Microbiology and Infection** 2001; 7 (Suppl.1): 339.