



Revisión

Importancia de la identificación de levaduras

Mireya Mendoza*

*Instituto de Biomedicina, Ministerio de Salud
Caracas - Venezuela*

Recibido 23 julio de 2005; aceptado 10 de agosto de 2005

Resumen: En esta revisión se hace referencia a las principales levaduras patógenas en humanos, que afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Se destaca la importancia que tiene el proceso de aislamiento e identificación a nivel de género y especie, que permite enriquecer, de manera más precisa, los datos sobre la casuística y epidemiología de las micosis causadas por levaduras, principalmente en el grupo de mayor impacto, referido como “levaduras emergentes”. También se señalan diversas técnicas y medios de cultivos, descritos en la literatura, para llevar a cabo los ensayos de identificación, los cuales podrían ser aplicables a muchos laboratorios de rutina y de especialización.

Palabras-clave: Levaduras, *Candida albicans*, *Candida* spp., identificación

Importance of yeasts identification

Abstract: This review refers to the main pathogen yeasts in humans, affect mainly immunocompromised patients. It stands out the importance of the isolation and identification process to the genus and species level, that allows to enrich, in a more precise way, the data about the casuistry and epidemiology of mycoses caused by yeasts, mainly in the group of greatest impact, referred as “emergent yeasts”. They are also pointed out diverse technical and cultivation media described at the literature, to carry out the identification assays, which could be applicable to several routine and specialization laboratories.

Keywords : Yeasts, *Candida albicans*, *Candida* spp., identification

* Correspondencia:
E-mail: mmendoz@telcel.net.ve

Introducción

El término levadura se refiere básicamente a un grupo de hongos unicelulares, donde las hifas y/o pseudohifas pueden o no estar presentes y tienen una fase sexual perfecta o teleomorfa. Sin embargo, las levaduras a las que no se le ha descrito aún la fase sexual, y sólo se le conoce la fase anamorfa, son denominadas como “formas parecidas a levaduras” o “*yeastlike*”; estas se reproducen por gemación [1]. En cuanto a la ubicación taxonómica, este último grupo es ubicado en la división Deuteromycota u hongos anamorfos, clase Blastomycetes o Levaduras. En cuanto al grupo teleomorfo, cuando la célula haploide de la levadura se conjuga y da origen a asco con sus ascosporas, son incluidas en la División Ascomycota, clase Ascomycetes. Las que producen basidios con basidiosporas, están entre

los Basidiomycota, clase Basidiomycetes [2,3]. En este artículo se empleará el término levadura en forma independiente.

Género *Candida*

En cuanto a hongos patógenos en humanos, existen cerca de 200 especies que han sido reconocidas; de estas, alrededor de 30 son levaduras de interés médico [1]. Entre ellas, desde el punto de vista clínico, han sido y siguen siendo relevantes las del género *Candida*, las cuales forman parte de la flora normal de nuestro organismo. Son los agentes causales de la candidiasis o candidosis, micosis oportunista, aguda, subaguda o crónica, de alta incidencia en nuestro medio y a nivel mundial; pueden afectar a indi-

viduos de cualquier edad, raza o sexo, siendo los factores predisponentes del huésped en combinación con los del microorganismo, los que favorecen el desarrollo de la infección.

Taxonómicamente, este género se encuentra clasificado en:

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Ascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae

En cuanto a la incidencia, en los últimos 20 a 30 años se ha elevado el número de casos de candidiasis, siendo hasta el presente *Candida albicans* el principal agente causal, encontrándose entre un 60-70% de los aislamientos clínicos [1]. En nuestro medio se reportó un 36% de muestras positivas para levaduras [4], un 25% de casos de micosis superficiales, entre 4-18% de casos en recién nacidos, 20-30% de casos de vulvovaginitis, 15-17% en embarazadas, y entre 80-90% de casos en enfermos con SIDA, siendo en este último caso, la candidiasis bucal la forma clínica más asociada [5]. En individuos infectados por VIH, se ha observado también, que un 90% puede sufrir un episodio de candidiasis orofaríngea [6]. En mujeres VIH positivo, la vulvovaginitis por *Candida* esta muy relacionada, así como los casos de recidivas. En estas pacientes se ha aislado *C. albicans* de secreción vaginal en un 20,75% y *Candida* spp. en 5,66% [7].

En función de sus características antigénicas, *C. albicans* ha sido clasificada en dos serotipos, A y B, por ensayos de aglutinación con sueros de pacientes de candidiasis, [8], siendo el serotipo A el más frecuente a nivel mundial [9], en nuestro medio [10] y en pacientes con SIDA [11].

Otra especie, morfológica y fisiológicamente similar a *C. albicans* es *C. stellatoidea*, que es poco patógena, pero se ha encontrado en algunas ocasiones asociada a casos de endocarditis. Estudios para su diferenciación con *C. albicans*, han confirmado por diversos ensayos de biología molecular la existencia de *C. stellatoidea* Tipo I, la cual no crece a 42°C, no asimila sacarosa y esta asociada al serotipo B de *C. albicans*. *C. stellatoidea* Tipo II, crece a 42°C, tampoco asimila sacarosa y es considerada como variante o análoga de *C. albicans* [12].

En los últimos veinte años se ha observado que alrededor de otras 10 especies del género *Candida* han incrementado su importancia, desde el punto de vista clínico, como agentes causales de candidiasis; entre estas tenemos: *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr* (sinónimo obsoleto: *C. pseudotropicalis*), *C. glabrata* (sinónimo: *Torulopsis glabrata*), *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae*, entre otras.

Estas levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y habitando como comensales en muchos mamíferos y aves. La frecuencia de casos de candidiasis reportados por estas levaduras esta entre 1 al 30 %. En

cavidad bucal se ha descrito la presencia de 8% de *C. tropicalis* y entre 3-6% de *C. krusei*, [6,13]. *C. glabrata* y *C. krusei*, suelen presentar mayor resistencia al imidazólico fluconazol, por lo que pacientes que reciben este fármaco como profilaxis tienen más riesgo de desarrollar infección por estas dos especies. Con respecto a los mecanismos de resistencia a los antifúngicos en *Candida*, una amplia y actualizada revisión se puede encontrar en la literatura [14].

Género *Cryptococcus*

En orden de importancia siguiendo a *C. albicans*, se encuentra la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*, agente causal de la criptococosis, micosis sistémica de evolución subaguda o crónica, que ocupa el cuarto lugar entre las enfermedades oportunistas en pacientes con SIDA [15]. En Venezuela, en este tipo de pacientes, constituye la tercera causa de muerte, después de la histoplasmosis y candidiasis [16]. A nivel mundial, esta micosis tiene una prevalencia del 3% en América y Europa, y de 20-35 % en África [17], afecta ambos sexos, siendo más frecuente en individuos entre los 30 y 60 años de edad, principalmente debilitados e inmunosuprimidos. Las formas clínicas más frecuentes son la meningitis y la meningoencefalitis; en algunos casos puede suceder con diseminación a otros órganos.

Del estado anamorfo de esta levadura se han descrito tres variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotipo D), ambas de distribución mundial y *C. neoformans* var. *gattii* (Serotipo B y C), limitada a regiones tropicales y subtropicales. En su estado teleomorfo, incluida en la división Basidiomycota, clase Basidiomycetes, se encuentra *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* para los serotipos A y D y *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* para los serotipos B y C [18].

Se ha sugerido que el habitat y la principal fuente de infección de la variedad *neoformans* es el excremento de aves; la variedad *gattii* ha sido asociada con los árboles de *Eucalyptus* spp., originarios de Australia.

Dentro de las 19 especies de *Cryptococcus* que han sido reconocidas, 6 han sido recuperadas ocasionalmente como agentes infecciosos: *C. albidus* var. *albidus*, *C. albidus* var. *diffluens*, *C. luteolus*, *C. laurentii*, *C. terreus* y *C. gastricus* [19].

Otros Géneros de Levaduras

Entre otro grupo de levaduras de interés médico, se pueden mencionar las ocho especies del género *Malassezia* [20], *Geotrichum candidum*, *Trichosporon* spp., *Rhodotulula mucilaginosa*, *Sporobolomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pneumocystis jirovecii* (especie que infecta al humano, antiguamente considerado como un protozooario y denominado *P. carinii*), y otras. El

alga aclorofílica del género *Prototheca* también es estudiada dentro de este grupo, por la similitud del cultivo con el género *Candida*. *P. zopfii* y *P. wickerhamii* son las más reportadas [1-3].

La mayoría de las levaduras antes mencionadas, constituyen en menor o mayor grado, parte de la microbiota normal del organismo. Su incidencia puede variar de acuerdo a la localización clínica y procedencia geográfica [21]. El incremento de la incidencia de casos clínicos, por algunas de estas levaduras, ha hecho que se les adjudique el término de "levaduras emergentes". Sin embargo, hace más de 20 años, se han tenido reportes de aislamientos de estas levaduras a partir de material clínico, pero por ser más numerosos en los últimos tiempos, han logrado un impacto significativo dentro de la casuística de las micosis [13,21,22].

En general, las patologías desarrolladas por este tipo de levaduras comunes de la flora cutánea, mucosa y gastrointestinal del organismo, pueden abarcar un amplio espectro clínico como son: lesiones superficiales (pitiriasis versicolor, dermatitis, foliculitis, etc), cutáneas (intertrigo, paroniquia, zona pañal, etc), lesiones de mucosa (oral, gástrica, entérica, genital) y lesiones sistémicas (septicemias, endocarditis, casos meníngeos, etc) [19].

La causa principal de patogenicidad de estas levaduras está relacionada con alteraciones del sistema inmunológico del huésped, así como con otros factores predisponentes, que puedan interferir en el equilibrio del nicho biológico que mantienen a estas levaduras en estado de comensal. Entre los factores desencadenantes podemos mencionar: embarazo, edades extremas (infancia y vejez), uso prolongado de antibióticos, antineoplásicos, glucocorticoides, drogas, uso de prótesis dentales, etc [23].

Diagnóstico

Primeramente se lleva a cabo la inspección clínica y posteriormente se realizan los estudios para la orientación y confirmación del diagnóstico; entre estos tenemos: estudio micológico (examen directo y cultivo), histopatológico, inmunoserológico y otros.

Estudio micológico

A) Examen directo (ED) o microscópico de la muestra clínica: es un método rápido para la visualización de las estructuras fúngicas. En una lámina portaobjeto se añade a la muestra clínica una gota de un aclarante (KOH 10-40%, Clorazol Black E), para favorecer la ruptura de los enlaces intercelulares y liberar la célula fúngica; se coloca el cubreobjeto y se examina directamente al microscopio de luz (o en microscopio de fluorescencia en el caso de usar Calcoflúor), observándose estructuras tales como: blastoconidias redondas u ovales, con o sin gemación, pseudohifas, (posiblemente *Candida* spp.); artroconidias y blastoconidias, (*Trichosporon* spp.); sólo artroconidias (*Geotrichum* spp.),

etc. La presencia de blastoconidias y pseudohifas está asociada con la forma patógena de *C. albicans*. En todo caso es importante señalar que el ED sólo refiere que se está en presencia de "estructuras compatibles con", siendo necesario el cultivo para aislar e identificar el microorganismo. En el caso de LCR, se emplea tinta china negra para el descarte de criptocosis; una gota del sedimento del LCR centrifugado se coloca en una lámina portaobjeto y se le añade una gota de la tinta y el cubreobjeto; al microscopio se pueden apreciar levaduras gemantes, de pared definida y cápsula refringente. Este examen sugiere la presencia de blastoconidias compatibles con *Cryptococcus* spp. Se precisa el aislamiento e identificación para definir la especie.

B) Cultivo: Se efectúa por siembra del material clínico en medios de cultivo como Sabouraud-Dextrosa-Agar, micosel, lactitmel, etc. La mayoría de estas levaduras presentan un crecimiento entre 3-5 días. El crecimiento del cultivo nos puede mostrar colonias pastosas compactas o rugosas de color blanco a crema (sugestivas de *Candida*, *Saccharomyces*, *Prototheca*), colonias anaranjadas o coral (*Rhodotorula*), mucoides (*Cryptococcus*), de consistencia dura, superficie rugosa y seca (*Geotrichum*, *Trichosporon*), etc.

Tomando en cuenta que estas levaduras se encuentran como comensales en el organismo, es fundamental confirmar su significado patológico, para lo cual se debe tomar en cuenta la positividad del ED y el crecimiento de un número considerable de colonias en el medio de siembra, así como su aislamiento en forma repetida del mismo sitio de la lesión. En el caso de procesos pulmonares la prueba más contribuyente para el diagnóstico, es el examen histológico [24].

El por qué de la identificación de levaduras

Como se ha señalado, una vez aislado el agente, sólo se puede sugerir el género al cual pertenece, poco se puede referir respecto a la especie. Para tal fin, se hace necesario recurrir a los diversos métodos de identificación, pero, ¿Es importante llevar a cabo ese tipo de estudio?

En respuesta a esto, McGinnis en 1980 [2], describe que "las levaduras son un grupo de hongos heterogéneos que superficialmente parecen homogéneos", lo cual ya sugería la necesidad de llevar a cabo métodos, que en lo posible, permitieran la identificación en cuanto a género y especie. Sin embargo, en la actualidad la importancia de identificar estos microorganismos conlleva aún otra serie de razones como:

1. La orientación para el tratamiento antifúngico: existen múltiples reportes en la literatura, sobre la resistencia innata y adquirida de algunas de estas levaduras de interés médico a los tratamientos antifúngicos de primera y segunda generación, como el caso ya mencionado de *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans*, las cuales con frecuencia pueden presentar resistencia al fluconazol [25]. Un caso de

septicemia por *C. lusitanae* resistente a Anfotericina B ha sido reportado [26]. También se ha señalado que a nivel de los serotipos A y B de *C. albicans* existen diferencias en cuanto a susceptibilidad frente a los azoles [27]. Este tipo de comportamiento no sólo afecta a las levaduras sino también a otros hongos filamentosos, como es el caso muy ilustrativo de *Scedosporium apiospermum*, sensible a un amplio rango de antifúngicos mientras que, *S. prolificans*, es resistente a los mismos [28]; de allí la gran importancia que tiene el llevar a cabo la identificación del microorganismo, garantizando la eficacia del tratamiento antifúngico.

2. Caracterización epidemiológica: Hoy en día, se refleja en muchas casuísticas y publicaciones científicas, la importancia que ha tenido el valorar e introducir en los laboratorios de rutina de micología las pruebas de identificación de levaduras, las cuales han permitido ampliar cada vez más el conocimiento de estos microorganismos, desde el punto de vista clínico, micológico y epidemiológico [4,13].

3. Estudio biológico y molecular: No cabe duda que la descripción de la nueva especie *Candida dubliniensis* en 1995, fue debida al sustento que proporcionaron las técnicas de biología molecular, una vez que los métodos convencionales de identificación, no fueron suficientes para lograr la discriminación entre esta especie y *C. albicans* [12]. Cada día, los estudios de biología molecular constituyen el asiento de toda investigación en el campo taxonómico y biológico, tanto de hongos como de cualquier otro microorganismo. Sin embargo, se considera que aún estas técnicas moleculares no deben ser abordadas en forma única, sino en conjunto con ensayos complementarios, que puedan permitir tener un conocimiento más integral con respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y genotípicos de las levaduras. Esto hasta que estas técnicas moleculares puedan ser estandarizadas, certificadas y aplicadas en muchos laboratorios de rutina.

Como identificar las levaduras

En la actualidad se cuenta con diversos métodos, los cuales varían en tiempo, especificidad, sensibilidad, costos, etc. De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad [29]. Sin embargo, cabe señalar que es un requisito indispensable para abordar estas técnicas contar con un personal bien entrenado para la aplicación e interpretación de las mismas.

Las técnicas de identificación pueden ser agrupadas en: 1. Estudio morfológico; 2. Estudio fisiológico y bioquímico; 3. Métodos automatizados; 4. Medios diferenciales o de identificación directa; 5. Métodos inmunológicos; 6. Biología molecular, y otros como son estudios quimio-taxonómicos [29,30,31].

Las dos primeras técnicas comprenden diversos ensayos, los cuales son referidos por lo general como pruebas convencionales de identificación.

1. El estudio morfológico comprende:

Evaluación macroscópica: examinar en un determinado medio de cultivo características de la colonia tales como: color, textura, topografía de la superficie y bordes de la colonia. Se ha referido que estos caracteres pueden variar de acuerdo a la fuente de carbono.

Evaluación microscópica: presencia o ausencia de hifas, pseudohifas, cápsula, blastoconidias, artroconidias, ballistoconidias, etc.

Producción tubo germinativo: Es una de las pruebas cortas que nos orienta principalmente hacia la identificación de *C. albicans*. Se debe recordar que la especie descubierta más reciente, *C. dubliniensis*, también produce tubo germinal en un corto periodo de tiempo. El ensayo se aplica colocando un pequeño inóculo de la levadura en suero humano, de conejo o ratón, clara de huevo o en solución proteica, por el lapso de 2-4 h a 37 °C. Se induce el desarrollo de una estructura tubular a partir del blastoconidio, sin constricción en su base, característica que lo diferencia de una pseudohifa (Figura 1).

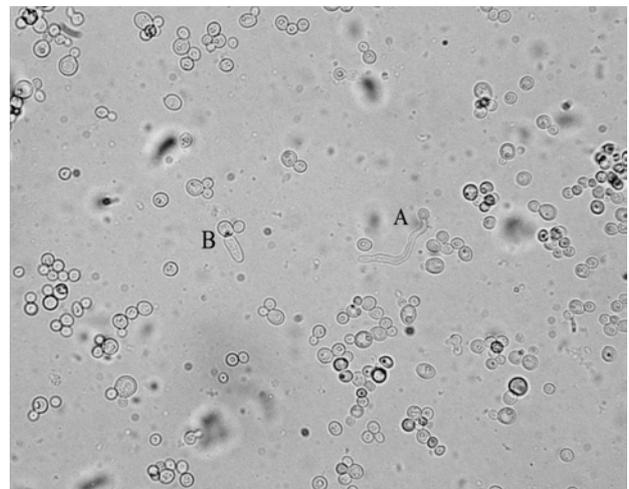


Figura 1. A) Tubo germinal de *Candida albicans* obtenido en suero humano a las 3 horas de incubación a 37 °C. B) Blastoconidio con pseudohifa. Microscopio de Luz, 100X.

Aunque es una prueba rápida, tiene el inconveniente de dar entre 5 a 10% de falsos negativos y positivos, además de requerir de buena experiencia técnica para su lectura [1,2].

Producción de clamidosporas: conforma otra de las pruebas rápidas que se utilizan para diferenciar *C. albicans* de las otras especies, teniendo en cuenta que *C. dubliniensis*, también forma clamidosporas en un lapso de 48 horas

de incubación a temperatura ambiente. Se requiere la aplicación de otros ensayos (fisiológicos, bioquímicos, moleculares) para diferenciar estas especies.

Entre los medios empleados para inducir clamidosporas se encuentran corn-meal, leche, crema de arroz, bilis, harina de trigo, adicionadas con 1% de Tween-80. (Figura 2).

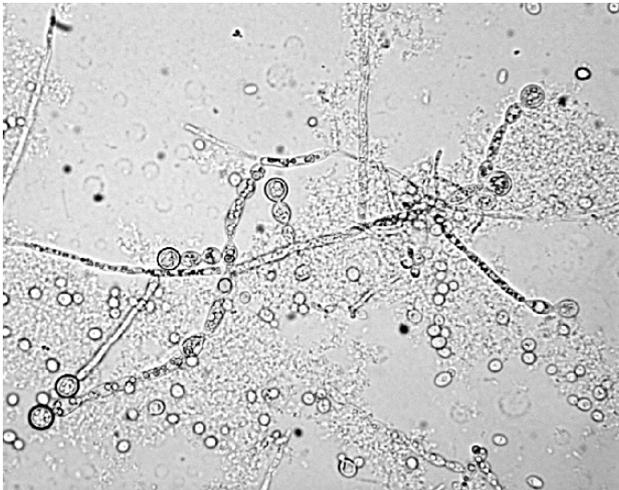


Figura 2. Clamidosporas de *Candida albicans* obtenidas a las 48 horas a temperatura ambiente en medio de harina de trigo. Microscopio de Luz, 40X.

Es importante recordar que las clamidosporas, células de resistencia, son vesículas de doble pared, producto del ensanchamiento celular por el proceso de almacenamiento de nutrientes. A diferencia de la clamidoconidia, la clamidospora no es una estructura de reproducción [1,2].

Demostración de cápsula

La cápsula es una estructura de naturaleza mucoide o polisacárida, que envuelve el blastoconidio; esta puede ser apreciada por contraste con tinta china o nigrosina, ya que las partículas constituyentes de la tinta no pueden penetrar a la cápsula, formando un halo definido alrededor del blastoconidio. Por contraste de fase, la cápsula también puede ser apreciada. La levadura de *Cryptococcus* se diferencia por tener una cápsula prominente, a diferencia del género *Rhodotorula*, que también puede producir cápsula, pero de menor proporción. Éste género contiene múltiples especies, pero la de mayor importancia en términos de patología en humanos es *R. mucilaginosa*. Se diferencia del género *Cryptococcus* por presentar pigmento de color coral a rojo naranja; raramente las colonias pueden ser blancas o crema [1,2].

Inducción de filamentización

Este ensayo se realiza comúnmente por la técnica de Dalmau en medio corn-meal-adicionado con 1% de Tween-80 [2], en el cual se inserta un trazado horizontal y vertical del inóculo en el medio y se le coloca un cubreob-

jeto estéril. La disminución de la tensión superficial del medio y de oxígeno induce y potencia en un lapso de 48 a 72 horas la producción de hifas, pseudohifas y otras estructuras de fructificación, que son arquetípicas para cada especie. Aproximadamente 90% de los aislados de *C. albicans* producen clamidosporas con este método [2], Figura 3.

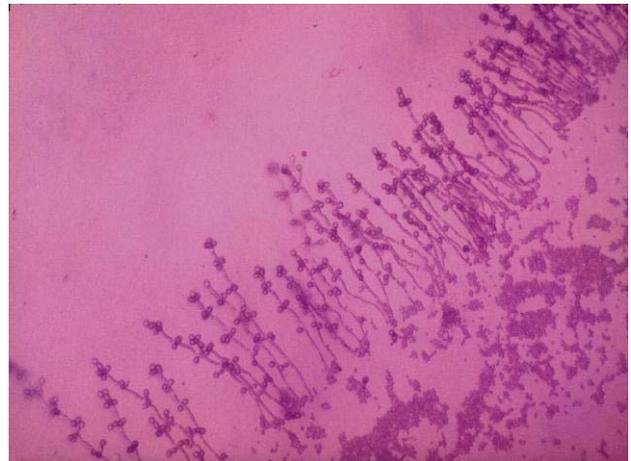


Figura 3. Cultivo por la Técnica de Dalmau en medio corn meal - Tween 80 1% para estudio morfológico de *Candida albicans* mostrando agrupamientos de blastoconidios dispuestos entre células de pseudohifas adyacentes. Microscopio Luz 40X.

Formación de asco y ascosporas

Las ascosporas son esporas haploides producidas dentro de un asco como resultado de cariogamia y meiosis; es una estructura característica de los *Ascomycetes*. Entre las levaduras patógenas para humanos que desarrollan estas estructuras se encuentran *Pichia anomala* (sinónimo: *Hansenula anomala*, teleomorfo de *C. pelliculosa*), *H. polymorpha* y *Saccharomyces cerevisiae* [3].

Existen diversos medios de cultivo comerciales (Agar YM, Kleyn's acetato, agar V-8, agar Gorodkova, etc), que son empleados para la demostración de la forma de reproducción sexual de éstos géneros. Estos medios se caracterizan por contener baja concentración de carbohidratos, lo cual disminuye el crecimiento vegetativo y favorece el desarrollo del asco. Sumando a esto una temperatura de 20-25°C, un pH entre 6-7 y un inóculo fresco de 2-3 días, se logran las condiciones ideales para su desarrollo[1,2]. El estudio de los caracteres del asco y ascosporas se realiza bajo montaje directo con objetivo de inmersión o a través de coloraciones, siendo en este caso recomendada la de Schaeffer-Fulton modificada por Wirtz, con la cual las ascosporas se tiñen de verde-azulado y el cuerpo vegetativo de rojo [2].

2. Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Los hongos son organismos quimiotrofos, que degradan los nutrientes del medio exterior, como los complejos de

hidrato de carbono a través de enzimas exocelulares (permeasas) en monosacáridos más simples para su absorción. Los estudios de evaluación nutricional sobre sustratos específicos ha permitido definir el patrón catabólico que puede presentar un determinado género o especie [32].

De este tipo de estudio se han derivado los ensayos de asimilación (auxonograma-degradación aeróbica) y fermentación (zimograma-degradación anaeróbica) de carbohidratos para la identificación de levaduras. En el auxonograma, la asimilación del azúcar se detecta por el crecimiento visible y cambio del indicador de color en el medio de cultivo, mientras que en el zimograma, su producto se detecta a través de la producción de gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). Patrones de asimilación y fermentación de muchos géneros y especies se encuentran disponibles en la literatura [1-3].

Detección de enzimas

Prueba de ureasa: mide la capacidad de la levadura de hidrolizar la molécula de úrea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa; esto genera un incremento del pH del medio y en consecuencia el cambio de color de naranja a fucsia [33]. Esta enzima por lo general esta ausente en el grupo de los Ascomycetes, pero está siempre presente en los Basidiomycetes. Es así como permite diferenciar los géneros *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, los cuales son ureasa positivos, de *Candida* y *Geotrichum* que son negativos a este ensayo, salvo algunas excepciones, como *C. krusei*, la cual puede o no presentarla [1-3].

Actividad de fenol-oxidasa: se produce en presencia de sustratos orto-fenólicos como ácido caféico o bilis esculina, los cuales son hidrolizados; los productos reaccionan con las sales de Fe^{+3} dando como resultado un pigmento oscuro o negro, indicativo de la positividad de la prueba. *C. neoformans*, la especie más patógena de este género, tiene la capacidad de producir esta enzima, sin embargo, esta puede ser variable en las otras especies del género. La asimilación del carbohidrato inositol es común a todas [1]. Otras pruebas enzimáticas como la detección de β -galactosidasa, gelatinazas y β -glucosidasa, son de gran utilidad en la identificación de levaduras. Por ejemplo, el ensayo de β -glucosidasa: positiva para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis* [12]. Sin embargo, reportes más recientes han demostrado la ausencia de esta enzima en algunos aislados de *C. albicans* [34].

Otras técnicas complementarias

Entre estas tenemos ensayos de termotolerancia a 37, 42 y 45°C, con lo cual se pueden diferenciar las especies termófilas. Se ha descrito que *C. dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por ausencia de crecimiento a 42 °C. Sin embargo, hallazgos más recientes demuestran que algunos aislados de *C. dubliniensis* tienen capacidad de

crecer a 42 y 45°C [35]. Entre otras técnicas, se contempla la asimilación de nitratos, la cual es básicamente positiva para los generos *Hansenula* y *Rhodotorula*.

En el ensayo de resistencia a cicloheximida (usando el medio de cultivo Micosel), crecen algunas especies de *Candida*, mientras que *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *G. candidum*, son sensibles. Otras especies de *Candida* y *Rhodotorula* pueden ser variables en su sensibilidad [1,2].

Un hallazgo de importancia a tomar en cuenta para estos estudios, es la procedencia clínica de la muestra, ya que se encontraron alteraciones morfológicas y bioquímicas (tubo germinal, producción de clamidosporas, asimilación de azúcares) de las levaduras de *C. albicans* y *C. tropicalis* aisladas de pacientes oncológicos, señalándose la importancia de un cultivo previo en caldo Extracto de Malta por 48 horas para reestablecer a la levadura los caracteres modificados [36].

3. Métodos Automatizados

Son métodos de identificación rápida basados en ensayos de asimilación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas, los cuales se encuentran estandarizados y simplificados en forma de sustratos liofilizados. A diferencia de las pruebas convencionales, que pueden tomar entre 2-20 días, el sistema automatizado permite la identificación de la levadura en un lapso de 24-48 horas y los resultados pueden ser leídos en forma manual o automática a través de un Software. Entre estos sistemas podemos mencionar el API *Candida*, API-ATB, ID 32C, API 20C, Vitek Systems, Baxter MicroScan System y otros (37). El Sistema Sensidant (Merck) probado en nuestro medio, reportó 75% de levaduras correctamente identificadas [38]. Otro estudio comparativo entre el método convencional y el Sistema ID 32C (BioMerieux) mostró 60% de concordancia, la cual se incrementó a 80% cuando se combinó con el estudio morfológico y las pruebas sugeridas por el sistema [39].

De acuerdo a estos resultados y nuestra propia experiencia, se considera que estos sistemas automatizados deben ser complementados con el estudio morfológico, sobre todo en el caso de especies poco comunes, ya que este estudio es una limitante en estos sistemas.

4. Medios de cultivo diferenciales

Otro método basado en la detección de actividad enzimática, ha sido desarrollado con mucho éxito en los últimos tiempos. Comprende una serie de medios de cultivo a los cuales se les ha adicionado sustratos cromogénicos o fluorogénicos, que ponen de manifiesto la presencia o no de un grupo de enzimas del hongo: L-prolina-aminopeptidasa, N-acetil- β -D-galactosaminidasa, β -D-glucosidasa, pirofosfato-diesterasa y fosfatasa ácida. En presencia de sustratos fluorogénicos, la reacción enzimática da lugar a compuestos fluorescentes, que pueden ser leídos con luz UV, mientras que un sustrato cromogénico

da lugar a una colonia pigmentada. Por ejemplo, *C. albicans* es L-prolina y β -galactosaminidasa positiva, mientras que en *C. tropicalis* la segunda enzima es negativa, lo cual hace que en presencia de la mezcla cromogénica, *C. albicans*, desarrolle una colonia color verde y *C. tropicalis* azul.

Estos medios de cultivo diferenciales, a pesar de arrojar una identificación presuntiva, tienen la gran ventaja de no requerir mucha experiencia técnica, son rápidos y específicos, permiten identificar el agente a partir del cultivo primario y discriminan entre mezclas de levaduras de una misma muestra, sin embargo, sólo pueden identificar unas pocas especies [40,41].

El medio CHROMAgar *Candida* (Biomedics) descrito por Odds y Barnaerts en 1994 [42], uno de los primeros en salir al mercado, ha mostrado un 100% de sensibilidad y especificidad en la identificación de *C. albicans* y *C. tropicalis*; también ha sido referido la identificación de *C. glabrata* y *C. krusei* [41]. Entre otra de sus ventajas resalta su utilidad en la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, las cuales desarrollan un color verde claro y verde oscuro respectivamente; similares resultados se han observado en el medio *CandidaID* [43]. En Venezuela se describió por primera vez la nueva especie de *C. dubliniensis* por estudios de caracteres fenotípicos, los cuales incluyeron el empleo de este y otros medios [44]. Sin embargo, Mesa y col., [45] no encontraron buena correlación con estos medios para la identificación. Un estudio más reciente, también en nuestro medio, identificó esta nueva especie por ensayos de PCR, más que por caracteres fenotípicos [35].

En la actualidad existen en el mercado una gran variedad de medios diferenciales que pueden diferir en cuanto a su sensibilidad, especificidad y costo, entre estos tenemos: *Albicans ID*®, *Chromalbicans Agar* (Biolife, Italia), *Candida ID*® (BioMerieux, Francia), *Fluoroplate Candida* (Merck, Alemania), [43,46-48].

5. Métodos Inmunológicos

Las técnicas serológicas siguen siendo una herramienta de gran valor en el diagnóstico de las micosis profundas, para la detección de antígenos o anticuerpos. Estos ensayos, han sido aplicados en el diagnóstico e identificación rápida de hongos con el uso de anticuerpos monoclonales o monoespecíficos por ensayos de Inmunodifusión Doble, inmunofluorescencia, aglutinación, ELISA e inmunoperoxidasa. Hoy en día disponemos de pruebas comerciales rápidas y de fácil ejecución como Bicholater Albicans y Krusei color (Francia), consistentes en partículas de latex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales que reaccionan en forma específica con antígenos de superficie de la levadura (49). Otras técnicas también están disponibles en el mercado para diagnóstico e identificación rápida del agente causal [50].

6. Estudios de Biología Molecular

Son herramientas de alto potencial tanto para el diagnóstico como para la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos. Estos ensayos están basados en el análisis de secuencias de ADN genómico, con el uso de secuencias cortas específicas de oligonucleótidos con técnicas de PCR [30] y PCR-EIA [51]. Métodos más avanzados están siendo realizados en formatos miniaturizados, donde se ensayan en una sola reacción secuencias de ADN o de péptidos para diagnóstico, identificación y evaluación de otros aspectos biológicos del microorganismo [52].

Muchos reportes han demostrado la aplicación de las técnicas moleculares en la identificación de hongos filamentosos [53] y levaduras (54). Hoy en día se han evaluado pruebas de ADN con secuencias especie-específica, derivadas de la región variable de la subunidad mayor 26S ribosomal del DNA para la identificación de las especies de *Candida* por PCR, así como también secuencias cortas de oligonucleótidos, que identifican y discriminan a través de PCR a *C. albicans* y *C. dubliniensis* [3,35,55]. Un ensayo de amplificación aleatoria de segmentos de ADN (RAPD) también ha sido propuesto [56].

Las técnicas de biología molecular tienen la gran ventaja de ser específicas, sensibles y eficientes, permiten diferenciar especies muy relacionadas entre sí desde el punto de vista taxonómico, así como la identificación en un corto período de tiempo, de hongos que desarrollan pocas o ninguna estructura fructífera. Sin embargo, debido a exigencias de costo, infraestructura y experiencia técnica requerida, están en el presente, más disponibles en laboratorios de referencia que de rutina.

Conclusión

Cada día es más relevante e importante en el diagnóstico de una determinada patología la identificación del microorganismo, en cuanto a género y especie. En buena hora se cuenta con el conocimiento, la experiencia y gran parte de las herramientas necesarias, para que un laboratorio de micología pueda implementar y realizar como rutina el aislamiento e identificación de un determinado agente causal de micosis, en particular de las levaduras, ya que se cuenta al menos con el estudio morfológico, pruebas bioquímicas y otros medios disponibles. Sin embargo, para garantizar el éxito de estos estudios, se hace énfasis en la necesidad de tener un personal calificado para llevar a cabo la identificación de levaduras y otros estudios que se puedan derivar.

La importancia que se brinde a este tipo de trabajo, es lo que puede llevar en un futuro a la creación y fortalecimiento de laboratorios especializados en el diagnóstico y estudio de las levaduras, lo cual traería como consecuencia un despliegue cada vez mayor sobre el conocimiento de estos microorganismos.

Agradecimientos

A la Lic. Primavera Alvarado y Tec. Sra. Elvia Díaz por su valioso apoyo técnico y revisión del manuscrito. A la Sra. Olga Vivas por el trabajo secretarial aportado.

Referencias

- [1] Fisher F, Cook NB. Fundamental of Diagnostic Mycology, WB Saunders Company, Pennsylvania; 1998.
- [2] Mc Ginnis M.R. Laboratory Handbook of Medical Mycology, Academic Press INC, New York-USA; 1980.
- [3] Hoog GS de, Guarro J. Atlas of Clinical Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, The Netherlands and Spain; 1995.
- [4] Panizo M, Reviákina V, Dolande M, Maldonado B. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas. Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "RR" (1996-2001). Rev Soc Ven Microbiol 2002; 22: 57-63.
- [5] Arenas R. Micología Médica Ilustrada, Primera Edición Interamericana. McGraw-Hill, 1993.
- [6] Aguirre, JM. Candidiasis oral. Gaceta Médica Bilbao 1992; 89: 169-171.
- [7] Hernández E, Colina M, Villalobos N. Infecciones bacterianas y micóticas del tracto genital inferior, en pacientes del sexo femenino, HIV positivas. Kasmera 2003; 2: 104-111.
- [8] Hansenclever H, Michell W. Antigenic studies of *Candida* I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1961; 82: 570-572.
- [9] Hansenclever H, Michell W. Antigenic studies as *Candida* IV the relationship of antigenic groups of call to their isolation from various clinical specimens. Sabouraudia 1963; 2: 201-204.
- [10] Mendoza M, Russian E, Villanueva E, Torres E de, Albornoz MC de. Serotipificación de 48 aislados de *Candida albicans*: predominio del Serotipo A sobre el B en Venezuela. Invest Clin 1992; 38: 33-37.
- [11] Oliver M, González MI de, Mendoza M, Albornoz MB de. Serotipos de *Candida albicans* aislados en pacientes VIH positivos. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 204-207.
- [12] Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennet DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species with associated oral candidosis HIV infected individuals. Microbiology 1995; 141:1507-1521.
- [13] Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida species* other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. Med Mycol 1998; 36: 156-165.
- [14] Akins RA. Review An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Med Mycol 2005; 43:285-318.
- [15] Arango M, Castañeda E. Micosis Humanas. Procedimientos diagnósticos. Edición CIB, Medellín-Colombia, 1995.
- [16] Ordaz PR. Criptococosis. En: Temas de Micología Médica, Editado por Albornoz MC, Caracas-Venezuela, 1996; pp 235-262.
- [17] Edwards VE, Sutherland JM, Tyrer JH. Cryptococcosis of the central nervous system: epidemiological clinical and therapeutic features. J Neurol Neurosurg Psychiat 1970; 33: 415-425.
- [18] Horta JA, Staats CC, Casali AK, Ribeiro AM, Schrank IS, Schrank A, Vainstein MH. Epidemiological aspects of clinical environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Med Mycol 2002; 40: 565-572.
- [19] Lacaz CDS, Porto E, Costa MJE. Micología Médica, 8ª Edición, SARVIER, Sao Paulo-Brasil, 1991.
- [20] Hernández HF, Mendez TLJ, Bazán ME, Arévalo LA, Valeira BA, López MR. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 141-144.
- [21] Okungbowa FL, Isikhuemben OI, Dede APO. The distribution frequency of *Candida species* in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 60-63.
- [22] Pemán J, Cantor E, Orero A, Viudes A, Frasset J, Gobernado M. y col. Estudio Multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. Rev Iberoam Micol, 2002; 19: 30-35.
- [23] Senet JM. Risk factors and physiopathology of candidiasis. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 6-13.
- [24] Rodulfo S, Mendoza M. Candidosis. En: Temas de Micología Médica. Editado por Albornoz MC de. Caracas-Venezuela. 1996; pp 65-80.
- [25] Drobacheff M, Millen L. Candidosis oropharyngea resistentes an Fluconazole che des malades infectes par le VIH. Ann Dermatol Venérel 1996; 123: 85-89.
- [26] Guinet R, Chanas J, Goullier A, Bonnefoy G, Ambroise-Thomas P. Fatal septicemia due to *Candida lusitanae* resistant to Anfothericin B. J Clin Microbiol. 1983; 18: 442-444.
- [27] Mendoza M, Russian E, Villanueva E, Torres ED, Albornoz MC de. Sensibilidad de los serotipos A y B de *Candida albicans* y de otras levaduras del género *Candida* frente a diferentes azoles. Rev Iberoam Micol 1994; 11: 74-76.
- [28] Carrillo AJ, Guarro J. In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium spp.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2151-2153.
- [29] Freydiere AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 85-89.
- [30] Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 1634-1641.
- [31] Paredes SF, Mora GJ, Sacian MP, García MP. La cromatografía gas-líquido con espectrometría de masas en la identificación de levaduras. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 33-37.
- [32] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los microorganismos, 8ª Edición Prentice Hall Iberia, Madrid-España, 1999; Cap. 4 págs. 109-148.
- [33] Mac-Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana S A. Buenos Aires, Argentina; 1980.
- [34] Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, Mantoan B, Pugliese A, Ito-Kuwa S, Nakamura K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 70-74.
- [35] Brito A. Detección de *Candida dubliniensis* en pacientes con candidosis del área metropolitana de Caracas. Tesis de Maestría. Universidad Experimental Francisco de Miranda. Falcón-Venezuela. Julio 2005.

- [36] Panizo M, Reviákina V, Bellorín E. Dificultades en la identificación de levaduras aisladas de pacientes oncológicos. Bol Soc Vzlan Microbiol 2000; 20: 104-107.
- [37] Salkin IF. Technology transfer and application in the clinical mycology laboratory for the 21 st century: potential for transfer and application of new technologies in routine laboratory operations industrialized concentrics. Med Mycol 1998; 36: 276-279.
- [38] Santiago A, Angulo E, Pabón R, Aceituno H. Diagnóstico diferencial de levaduras mediante método automatizado. Bol Soc Vzlan Microbiol 1997; 17: 62-64.
- [39] Bukonja AM, Maldonado BM, Reviákina V, Dolande ME. Estudio comparativo entre el sistema ID 32C y el método convencional para la identificación de levaduras de interés clínico. Bol Soc Vzlan Microbiol 1997; 7: 65-68.
- [40] Hoope JE, Frey P. Evaluation of six comercial test and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 188-191.
- [41] García MP, García AR, Hernández MJM, Marín P, Tallero E, Mora J. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 131-135.
- [42] Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida* a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida species*. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
- [43] Quindós G, Alonso VR, Heloo S, Arechavala A, Martín ME, Negroni R. Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (*Candida ID*®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 23-28.
- [44] Mata ES, Capriles CH de, Sánchez L, Gallardo S, Pérez C, Colella LS, Magaldi S, Reyes H, Ontiveros J, Olaizola C, Suárez R. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en Venezuela. Antib e Infect 2002; 10: 165-170.
- [45] Mesa LM, Arcaya N, Caños O, Machado Y, Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotipicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 135-138.
- [46] Godoy P, Almeida LP, López CA. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio Cromogénico *Albicans ID*. Rev Iberoam Micol, 2001; 18: 197-199.
- [47] Carrillo MAJ, Quindós G, Cárdenas CD, Alonso VR, Arévalo P, Brió S, Madariaga Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 105-108.
- [48] Manafí M, Willinger B. Rapid identification of *Candida albicans* by Fluoroplate *Candida* agar. J Microbiol Methods 1991; 14: 103-107.
- [49] Freydiere AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid Identification of *Candida albicans* and *Candida krusei* colonies. J Clin Microbiol 1997; 35: 877-880.
- [50] Pontón J. Diagnóstico Microbiológico de las Micosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 25-29.
- [51] Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida species* with Species Specific DNA probes. J Clin Microbiol 1998; 36: 3260-3265.
- [52] Fodor SPA, Rava RP, Huang XC, Pease AFC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. Nature 1993; 364: 555-556.
- [53] O'Donnell K, Gray LE. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solanii F sp. phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. Mol Plant Microbe Interact 1995; 8: 709-716.
- [54] Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF. Detection of *Candida albicans* and other yeast in blood by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 228-231.
- [55] Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology 1999; 145: 1871-1882.
- [56] Vargas AR, Garaizar J, Ponton J, Quindós G. Utilidad de la amplificación aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 10-13.