

María José Linares Sicilia
Francisco Solís Cuesta

11.1. Fundamento

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

11.2. Identificación mediante criterios morfológicos

Los criterios morfológicos pueden ser, a su vez, macro o microscópicos.

11.2.1. Criterios macroscópicos

Estos criterios tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo.

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). Sin embargo, el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras (Capítulo 3).

En el medio SDA las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisas (Figura 11.1) o rugosas (Figura 11.2), con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen.

Por lo general las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias. Si se observa un micelio aéreo definido, debe considerarse la posibilidad de que se trate de un hongo dimórfico o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como *Geotrichum* (Figura 11.3), *Galactomyces*, *Trichosporon* (Figura 11.4) o *Blastoschizomyces* (su teleomorfo *Dipodascus*).

Una colonia de aspecto y consistencia mucoides sugiere la formación de cápsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *Cryptococcus neoformans* (Figura 11.5).

Las colonias de color rojo-anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, son características de las especies del género *Rhodotorula* (del gr. *rhodo*, rojo) (Figura 11.6) y *Sporobolomyces* (anaranjado), color que manifiestan estas levaduras por su riqueza en carotenoides.

Pero no todas las colonias blancas y cremosas son levaduras; las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*, tras incubación a 28 °C durante 3-4 días, desarrollan unas colonias blancas cremosas muy parecidas a las producidas por el género *Candida* (Figura 11.7).

11.2.2. Criterios microscópicos

Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes:

Prueba del tubo germinal o filamentosidad precoz

El tubo germinal es una extensión filamentosas de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre (Figura 11.8).

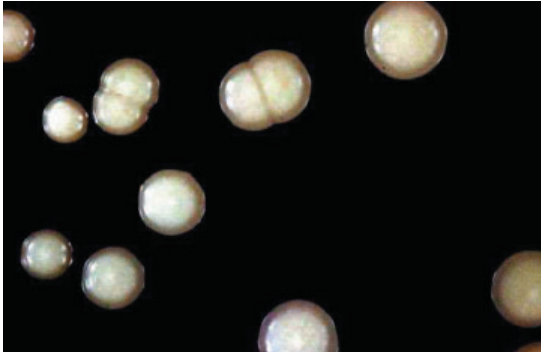


Figura 11.1. Aspecto macroscópico de las colonias de *Candida albicans* en SDA.

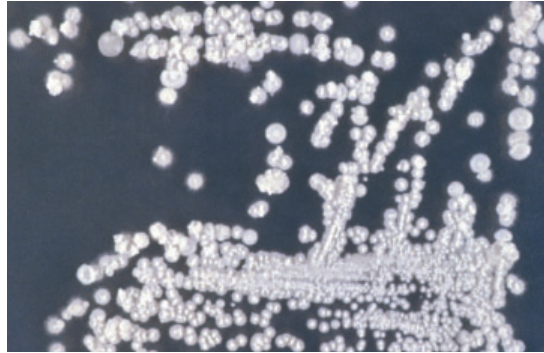


Figura 11.4. Aspecto macroscópico de las colonias de *Trichosporon beigeli* en SDA.

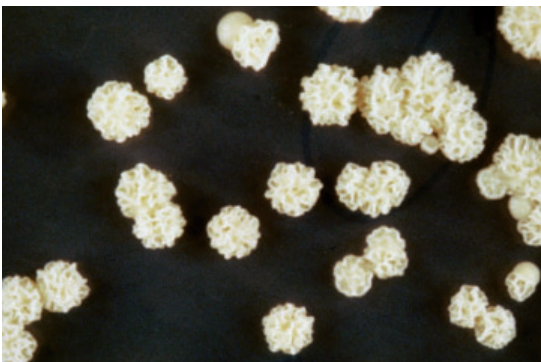


Figura 11.2. Aspecto macroscópico de las colonias de *Candida parapsilosis* en SDA.



Figura 11.5. Aspecto macroscópico de las colonias de *Cryptococcus neoformans* en SDA.

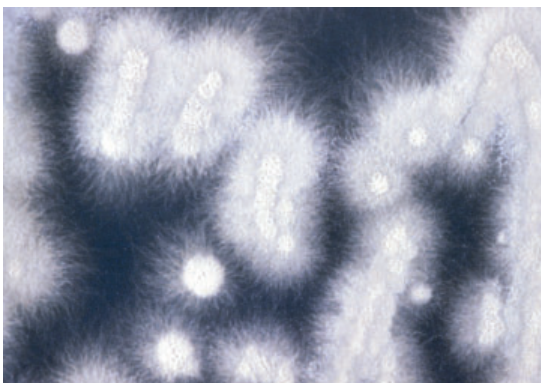


Figura 11.3. Aspecto macroscópico de las colonias de *Geotrichum candidum* en SDA.



Figura 11.6. Aspecto macroscópico de las colonias de *Rhodotorula rubra* en SDA.

Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*, aunque no está exenta de falsos negativos.

Falsos negativos

- Aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* son negativas para tubos germinales.
- Si se utiliza un inóculo demasiado abundante de levaduras, también pueden obtenerse falsos resultados negativos.

Metodología

1. Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano o de conejo.
2. Incubar a 35 °C durante 2 h.
3. Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar a x100, x400 ó x1.000.

Interpretación

La prueba es positiva si se visualizan tubos germinales (Figura 11.8).

Variantes

Además de la técnica con suero, el test de filamentación puede realizarse utilizando otros medios de cultivo:

- a) **Plasma de conejo:** Berardinelli y Opheim [1] describieron un medio de inducción de tubos germinales constituido por tres partes de coagulasa plasmática de conejo con EDTA (BBL Microbiology Systems) y dos partes de caldo Try-Soy (Scott Laboratories, Inc). La inoculación, incubación e interpretación son similares a la técnica con suero.
- b) **Medio de cultivo sólido Oxgall-Tween-ácido cafeico (TOC):** [Oxgall 10 g, agar 20 g, Tween 80 (solución al 10%) 10 ml, ácido cafeico 0,3 g, agua destilada 1.000 ml]. La utilización de este medio permite la visualización del tubo germinal y también de clamidosporas [2]. Para su realización se estría una pequeña porción de la colonia sobre al agar TOC y a continuación se coloca con suavidad un cubre-objetos estéril (flameándolo suavemente) sobre la superficie inoculada (para evitar la acumulación de humedad es preciso no presionar el cubre-objeto sobre

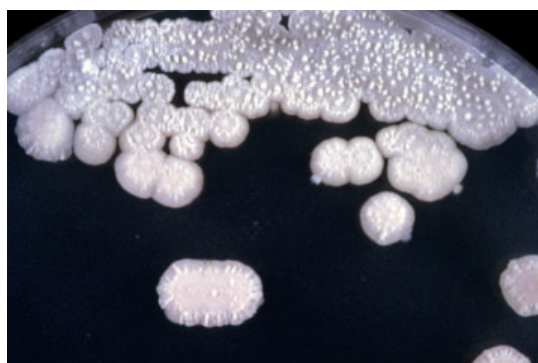


Figura 11.7. Aspecto macroscópico de las colonias de *Prototheca wickerhamii* en SDA.



Figura 11.8. Producción de tubo germinal o filamentación precoz por *Candida albicans*.

la superficie del agar). Se incuba a 35 °C, en 10% de CO₂, durante 2 h, manteniendo la tapa de la placa ligeramente abierta para que todo el cultivo sea alcanzado por el CO₂. La prueba es positiva si se visualizan los tubos germinales en la zona de inoculación a bajo aumento (x100-x400).

Formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas

La formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas o artrosporas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras.

Ante la presencia de estructuras con aspecto de **hifas**, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidias y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias. Si el desarrollo en medios especiales (ver más adelante) revela la presencia de pseudohifas y blastoconidias,

nidias, la levadura a identificar pertenece a alguna especie del género *Candida*. Si por el contrario, revela verdaderas hifas y artroconidias, lo más probable es que se trate de especies de *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Galactomyces* o *Blastoschizomyces*.

Trichosporon y *Blastoschizomyces* producen tanto **artroconidias** como **blastoconidias**; estas últimas nacen en brotes de los ángulos de las artroconidias adquiriendo la forma característica de “oreja de conejo” (Figura 11.9). Las especies *Galactomyces geotrichum* (*Geotrichum candidum*) y *Blastoschizomyces capitatus* (*Geotrichum capitatus*) también producen blastoconidias a partir del ángulo de la artroconidia, pero, en este caso, forman una estructura denominada “palo de hockey” (Figura 11.10). *C. tropicalis* produce pequeñas cantidades de blastoconidias, muy esparcidas o en pequeños grupos a lo largo de las hifas. Sin embargo, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* y *C. krusei* se ordenan a lo largo de una corriente de blastoconidias, siendo esta la característica que permite su identificación; además, algunas cepas pueden producir hifas gigantes.

Las **clamidosporas** son formas de resistencia, redondas u ovales, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales. Su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans* [3] (Figura 11.11). También puede hacerse una identificación presuntiva de esta especie si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidias, a intervalos regulares, a lo largo de la pseudohifa.

Metodología

Agar harina de maíz

A este medio comercializado (Oxoid) debe agregarse Tween 80 (polisorbato) a una concentración final de 0,02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias (Capítulo 3) [3].

Agar harina de maíz

Procedimiento

1. La inoculación se debe realizar, según la técnica de Dalmau [4], haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un ángulo aproximado de 45°.
2. Colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra.
3. Incubar las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 h y luego examinar al microscopio a través del cubre-objetos a x100, x400 ó x1.000 (Figura 11.11).

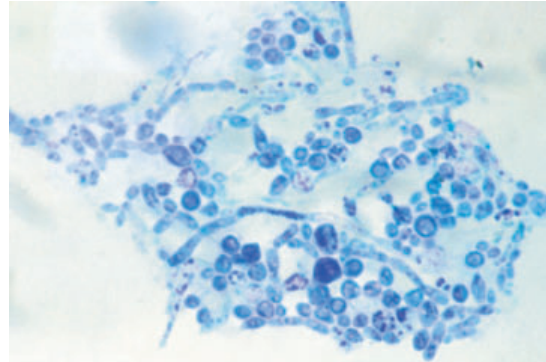


Figura 11.9. Aspecto microscópico de *Trichosporon beigeli* (x1.000) que muestra artrosporas y blastosporas.

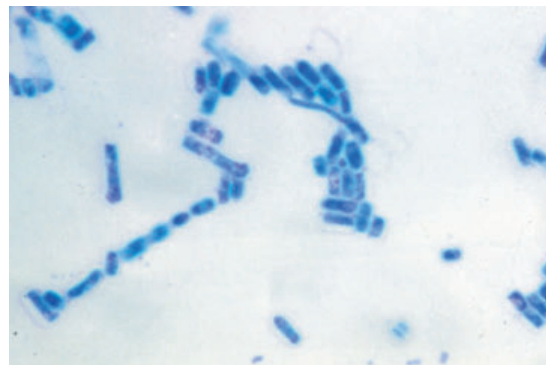


Figura 11.10. Aspecto microscópico de *Geotrichum candidum* (x1.000).



Figura 11.11. Formación de pseudomicelio y clamidosporas por *Candida albicans* (x400).

TOC

Este medio confirma la determinación de tubo germinal y clamidosporas en agar. Si no se observan tubos germinales una vez realizada la primera lectura a las 2 h de incubación, a 35 °C y en atmósfera de O₂, la placa puede incubarse durante 24-48 h más para visualizar el desarrollo de clamidosporas [2].

Leche diluida

En 1976 Feo y Pacheco [5], estudiando por separado el perfil de los componentes del medio lactrimel (leche + harina de trigo + miel) en la formación de clamidosporas, comprobaron que la leche entera (pasteurizada y homogeneizada) favorecía la producción de las mismas, por lo que propusieron un nuevo medio para su detección: el medio de leche diluida (leche natural 170 ml, agua destilada 1.000 ml, cloranfenicol 0,25 g).

Leche diluida
<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Emulsionar una colonia joven en 3-4 ml del medio. 2. Incubar a 28-30 °C durante 24-48 h. 3. Observar una gota de la emulsión al microscopio (x100 ó x400). <p>Interpretación</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. albicans</i> desarrolla abundantes pseudomicelios y clamidosporas (Figura 11.11).

Según nuestra experiencia, el medio de leche diluida es excelente para la investigación de clamidosporas, blastoconidias, hifas, pseudohifas y artrosporas. Estas características unidas a su fácil obtención y bajo coste le convierten en un medio muy recomendable en la rutina de un laboratorio de Micología para la detección de estas formaciones microscópicas [3].

Tinciones

El estudio microscópico de los organismos levaduriformes o microorganismos relacionados (género *Prototheca*) se puede llevar a cabo mediante tinciones, ya sea tinción simple (Figuras 11.12 y 11.13) o tinción de Gram (Figura 11.14); con esta tinción, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas (Capítulo 14).

Mediante estas tinciones también se puede observar la formación de blastosporas, artrosporas, hifas, pseudohifas o endosporas (autoesporas esféricas de 4-11 µm de diámetro incluidas en una teca, que puede visualizarse también vacía); estas últimas son típicas de las especies del género *Prototheca* (Figura 11.15).

11.3. Identificación mediante criterios bioquímicos

11.3.1. Criterios bioquímicos enzimáticos

Medios cromogénicos

Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24 a 48 h.

El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos.

Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. Aunque, según nuestra experiencia, sólo debería utilizarse como medio de aislamiento primario en aquellas muestras con alta sospecha de micosis por levaduras.

CHROMagar *Candida*®

El medio CHROMagar *Candida* (CHROMagar) fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida* [6]. CHROMagar *Candida* permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio.

La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37 °C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color. Al cabo de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C [7]. *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio (Figuras 11.16 y 11.17).

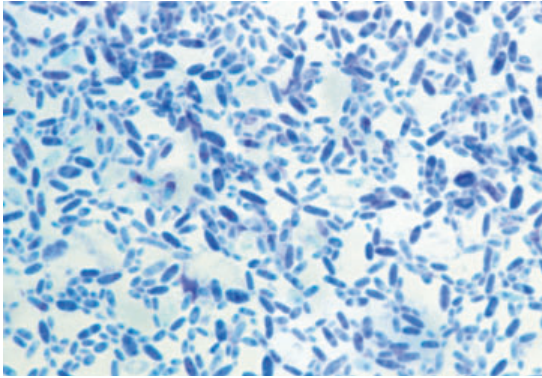


Figura 11.12. Aspecto microscópico de *Candida parapsilosis*. Tinción simple con azul de metileno (x1.000).

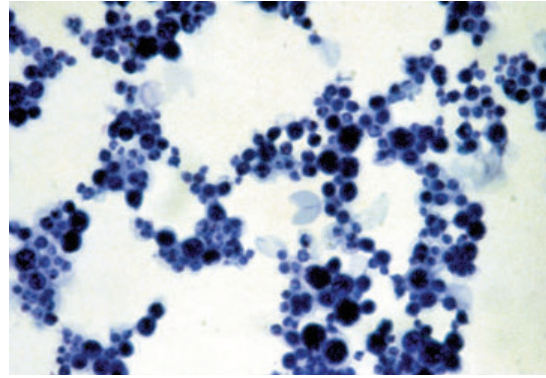


Figura 11.15. Aspecto microscópico de *Prototheca wickerhamii* (x1.000). Se observan las endosporas y las tecas vacías.

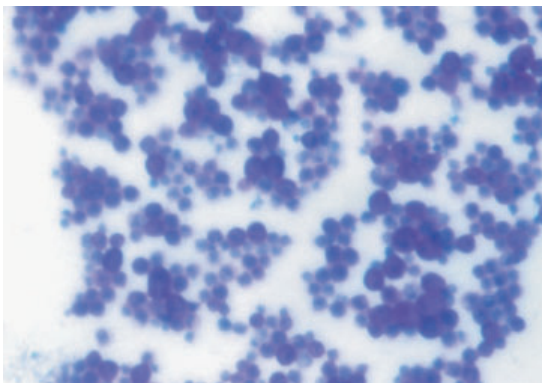


Figura 11.13. Aspecto microscópico de *Cryptococcus neoformans*. Tinción simple con azul de metileno (x1.000).



Figura 11.16. Crecimiento en CHROMagar Candida de *C. albicans* (verde) *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa y rugosa), *C. parapsilosis* (rosáceo-lisa), *Prototheca wickerhamii* (crema).

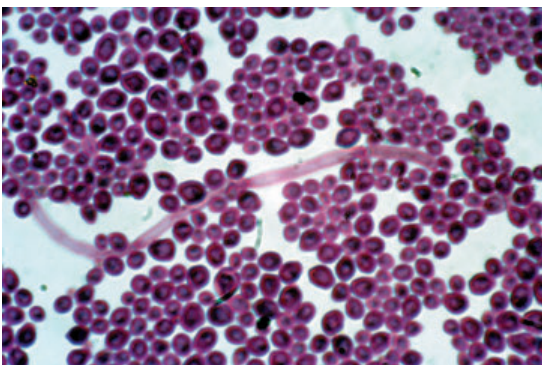


Figura 11.14. Aspecto microscópico de *Candida albicans*. Tinción de Gram (x1.000).

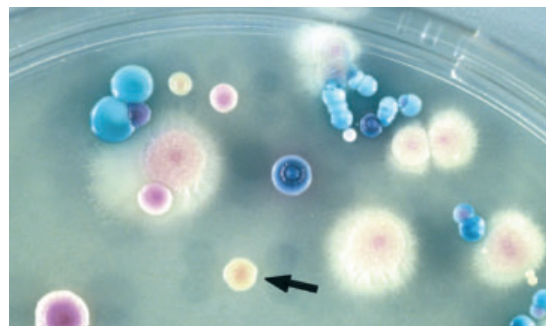


Figura 11.17. Crecimiento en CHROMagar Candida de *C. albicans* (verde) *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa y rugosa), *C. parapsilosis* (rosáceo-lisa) y *Prototheca wickerhamii* (crema, flecha).

COLOREX Candida®

Colorex Candida® (Biomedics) es un nuevo medio cromogénico y diferencial que facilita la identificación presuntiva de algunas de las levaduras de mayor importancia en clínica (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*).

La siembra se realiza según las técnicas habituales y las placas se incuban a 30-37°C, según el origen de la muestra, durante 24-48 h.

En este medio, *C. albicans* desarrolla colonias verdes, *C. tropicalis* azules-grisáceas y *C. krusei* colonias rosas rizadas.

Cromogen Albicans®

Cromogen Albicans (Biomedics) es un medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento e identificación de *C. albicans* en muestras vaginales, rectales, escamas, orina, pus, escobillonados bucales, etc.

La siembra se realiza según las técnicas habituales y las placas se incuban a 30-37 °C, según el origen de las muestras, durante 24-48 h.

Las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul verdoso característico, dependiendo del periodo de incubación y la temperatura, con formas redondeadas, lisas y ligeramente elevadas. Las otras especies de levaduras aparecen de color blanco cremoso y necesitan una identificación bioquímica posterior.

Candida ID®

El medio Candida ID (bioMérieux) es un medio cromogénico que permite el aislamiento de organismos levaduriformes, la identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*.

La inoculación e incubación son similares a las descritas para otros medios cromogénicos. En Candida ID, las colonias de *C. albicans* son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de bordes netos y de color azul (cuya intensidad varía en función del tiempo de incubación). Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr* desarrollan un color rosa a las 48 h de incubación. Otras especies, como *C. famata*, *C. humicola*, y *Cryptococcus neoformans*, pueden originar colonias rosas más o menos intensas. El resto de las especies desarrolla un color blanco-crema, requiriendo una identificación bioquímica posterior (Figura 11.18).

Albicans ID2®

El medio Albicans ID2 (bioMérieux) es muy parecido al anterior. Se ha enriquecido la fórmula para facilitar el aislamiento y la identificación de las colonias de *C. albicans* que desarrollan un color azul más intenso. Además, permite la identificación presuntiva de *C. tropicalis* ya que presenta una tonalidad verdosa en este medio. Las colonias de las demás especies son de color blanco.

La inoculación e incubación son similares al medio anterior.

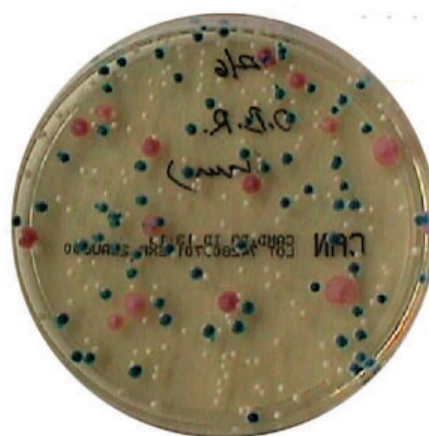


Figura 11.18. Crecimiento de *Candida albicans* (colonias azules) en el medio Candida ID (bioMérieux). El resto de las especies se manifiesta de color rosa o blanco.

Candida ID2® (CAN2)

El medio Candida ID 2 (bioMérieux) es un medio cromogénico destinado al aislamiento selectivo de levaduras, identificación de la especie *C. albicans* y diferenciación presuntiva de un conjunto de especies como *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*. Este medio se ha presentado como una modificación de la fórmula anterior (medio CandidaID-CA). La inoculación e incubación se llevará a cabo igual que en los casos anteriores, tras 24-48 h. a 30-37°C, se observará el color de las colonias. Azul pálido a azul oscuro es propio de *C. albicans*; rosa es característico de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*, la identificación de estas especies debe continuarse por pruebas bioquímica y/o inmunológicas. Las colonias de color blanco crema no pueden identificarse de forma presuntiva por lo que deben utilizarse técnicas bioquímicas y/o inmunológicas (Figura 11.19).



Figura 11.19. Crecimiento de *C. albicans* (colonias azules), *C. tropicalis* y *C. lusitanae* (colonias rosas) y *C. glabrata* (colonias blancas) en el medio Candida ID 2 (CAN2) (bioMérieux).

CandiSelect®

El medio CandiSelect (Bio-Rad) es un medio selectivo que permite la identificación de *C. albicans* mediante la hidrólisis del sustrato cromogénico presente lo que origina el desarrollo de un color azul por las colonias de esta especie.

La inoculación e incubación son similares a los otros medios cromogénicos. *C. albicans* se identifica por la presencia de colonias lisas azules y el resto de las levaduras manifiesta un color blanco en sus colonias. A las 48 h de incubación, algunas cepas de *C. tropicalis* y *Trichosporon* spp. pueden también desarrollar colonias azules, pero morfológicamente son diferentes a *C. albicans*.

Fluoroplate Candida®

El Agar Fluoroplate Candida (Merck) permite identificar macroscópicamente *C. albicans* por su capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida, por la enzima N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa), originando una fluorescencia blanquecina al iluminar la placa con luz ultravioleta. El resto de las especies no presenta fluorescencia.

La siembra en este medio se realiza de forma convencional y las placas se incuban a 30-37 °C durante 18-24 h. La lectura se realiza, en la oscuridad, colocando las placas sobre un transiluminador de luz ultravioleta de 365 nm (Linus).

Agar SDCA-MUAG®

El agar SDCA-MUAG (Biolife) es un medio muy parecido al anterior en cuya composición está presente, como sustrato, el 4-metilumbeliferil-2-acetamida-2-desoxi-β-D-galactosaminida. Se inter-

preta de igual forma por la aparición de fluorescencia difusible de las colonias de *C. albicans*, emitida al iluminarse con luz ultravioleta a 365 nm.

Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans*

En el mercado existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas (β-galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans* [8].

Para la detección de estas enzimas, los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos o cromogénicos.

Sistemas enzimáticos que utilizan sustratos fluorogénicos

Para su utilización, todos estos sistemas requieren el empleo de una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm (Linus).

BactiCard Candida®

La tarjeta BactiCard Candida (Remel) integra dos tests independientes para detectar la presencia de las enzimas β-galactosidasa (MUGAL) y L-prolina aminopeptidasa (PRO). La enzima MUGAL tiene la capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida y producir la liberación de 4-metilumbeliferona que es una sustancia fluorescente capaz de ser detectada al iluminarse con luz ultravioleta de 365 nm. La enzima PRO hidroliza al sustrato L-prolina-β-naftilamida y reacciona con el *Color Developer* originando un color rojo (Figura 11.20).



Figura 11.20. Sistema BactiCard Candida (Remel).

Bactocard
<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> Inocular sólo una cepa en cada tarjeta. Rehidratar cada círculo de la tarjeta con 1 gota del fluido rehidratante BactiCard Candida (sin sobrepasar el área del test). Inocular cada círculo de la tarjeta con un inóculo visible del aislamiento a identificar utilizando la varilla aplicadora. Incubar la tarjeta inoculada durante 5 min a temperatura ambiente. Añadir 1 gota de BactiCard <i>Color Developer</i> al círculo del test PRO y observar el color desarrollado a los 30 segundos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo:</i> Color rojo. • <i>Negativo:</i> No hay cambio de color. Añadir 1 gota del reactivo MUGAL BactiCard al círculo del test MUGAL. Observar este último círculo en oscuridad con una lámpara de luz ultravioleta: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Positivo:</i> Azul fluorescente brillante. • <i>Negativo:</i> No hay fluorescencia. <p>• Además de BactiCard Candida, existen otros sistemas comercializados [8] que detectan estas enzimas y cuyo procesamiento e interpretación de resultados es muy similar (Tabla 11.1).</p>

Tabla 11.1. Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* utilizando sustratos cromogénicos^a.

Nombre comercial	Sustrato	Tiempo incubación (Temperatura)
Albicans-Sure (Clinical Standars Labs)	4MU ^c N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
Albistrip (Lab M. Ltd)	4MU N-acetil galactosaminida Prolina-p-nitroanilida	5 min (37 °C)
BactiCard Candida (Remel)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
RapID Albicans (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	2 h (37 °C)
MUAG test ^b (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida	3 min (ambiente)

a: Detectan β-galactosaminidasa y L prolina aminopeptidasa. Se necesita lámpara de luz ultravioleta.
 b: Sólo detecta β-galactosaminidasa.
 c: Metil Umbeliferil.

Sistemas enzimáticos que utilizan un sustrato cromogénico

Estos sistemas utilizan sustratos cromogénicos para detectar las enzimas MUGAL y PRO por lo que no requieren el uso de la lámpara de luz ultravioleta. Entre ellos destacan:

Candida albicans Screen®

Este sistema (Remel) utiliza como sustratos p-nitrofenil-N-β-acetil β-D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehido. Requiere una incubación de 90 min a temperatura ambiente.

Murex *C. albicans* CA50®

Murex *C. albicans* (Murex Diagnostic) utiliza como sustratos p-nitrofenil-N-β-acetil β-D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehido. Requiere una incubación de 30 min a 37 °C.

Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. glabrata*

GLABRATA RTT®

Es un método sencillo que precisa un pequeño inóculo para su realización y cuyos resultados se obtienen en menos de 20 min, por lo que actualmente es la técnica comercializada más rápida para la identificación de *C. glabrata*.

GLABRATA RTT [9,10] (Fumouze Diagnostics) consiste en un panel plástico de tres pocillos con medio deshidratado (T, M y B); los pocillos T y M contienen trehalosa y maltosa, respectivamente, y si éstos azúcares son asimilados por la levadura, se origina glucosa que es detectada mediante una reacción de oxidación. El pocillo B se utiliza como control y manifiesta la presencia de cualquier carbohidrato libre que, procedente del medio de cultivo, pudiera dar lugar a un resultado falso positivo en los otros pocillos. Solo con las cepas de la especie *C. glabrata* se obtiene un resultado positivo en el pocillo de trehalosa y negativo

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

en el de maltosa; las demás levaduras son trehalosa negativa o positiva, pero en los casos positivos, la maltosa también es positiva (Figura 11.21).

GLABRATA RTT

Procedimiento

1. Suspender 4-6 colonias de la levadura a ensayar, a partir del medio de cultivo, en 100 μ l de agua destilada (turbidez 3 en la escala de McFarland).
2. Depositar 25 μ l en cada uno de los pocillos (T, M y B).
3. Incubar el panel durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 25 μ l de reactivo revelador.
5. Incubar el panel durante 10 min a temperatura ambiente (Figura 11.21).
6. Leer visualmente los pocillos.

Interpretación

- *Positivo*: coloración anaranjada-marrón.
- *Negativo*: falta de coloración.
- Las pruebas con el pocillo B positivo se consideran no valorables.

4 a 6 colonias en 100 μ l agua destilada

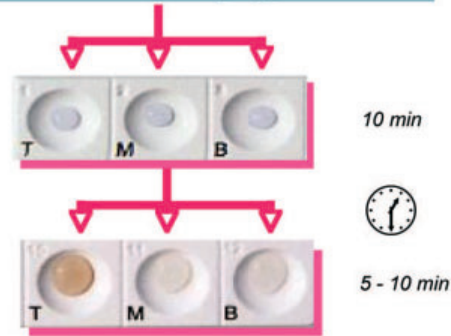


Figura 11.21. Esquema de realización de la prueba GLABRATA RTT y ejemplo de un resultado positivo (tomado de Pemán et al. [10]).

Identificación de *Cryptococcus neoformans* por métodos enzimáticos

Detección de ureasa

Una levadura con reacción positiva a la prueba de la ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*. Concretamente, las cepas de *C. neoformans* que son grandes productores de ureasa, comienzan a provocar cambio de color a las 2 h de incubación a 35 °C.

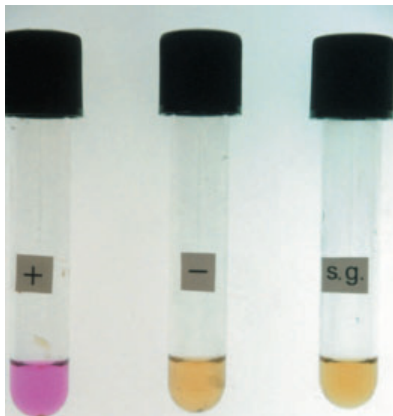


Figura 11.22. Prueba de la ureasa.

Ureasa

Procedimiento

1. Pasar la punta de un aplicador de algodón, impregnado con agar base ureasa de Christensen, sobre la superficie de dos o tres colonias aisladas del microorganismo a estudiar, de un cultivo de 48 a 72 h en cualquiera de los medios habituales.
2. Colocar el aplicador inoculado en un tubo con 3 gotas de cloruro de benzalconio al 1% (ajustar el pH a 4,8).
3. Presionar con fuerza la punta del hisopo contra el fondo del tubo para que se desprendan los microorganismos contenidos en las fibras de algodón.
4. Tapar el tubo e incubar a 45 °C.
5. Examinar el tubo a los 10, 15, 20 y 30 min.

Interpretación

- El desarrollo de un color rojo-púrpura, indica el resultado positivo de la prueba (Figura 11.22).

Esta prueba también puede utilizarse para diferenciar *Trichosporon* de *Geotrichum*; la mayoría de las especies de *Trichosporon* son ureasa (+) mientras que las de *Geotrichum* son ureasa (-).

Prueba de la enzima Nitrato-reductasa

La capacidad de *C. neoformans* de reducir nitratos a nitritos es una prueba de utilidad cuando se pretende identificar esta levadura (Figura 11.23).

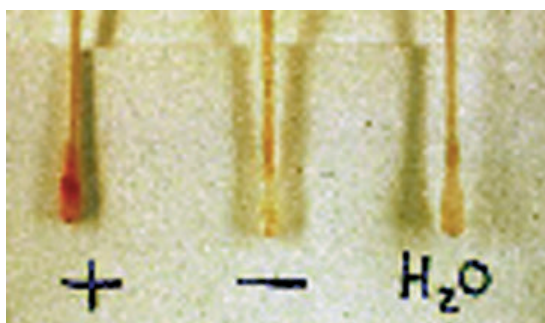


Figura 11.23. Prueba de la nitrato-reductasa.

Prueba de la Fenol-Oxidasa

C. neoformans produce fenol-oxidasa, una enzima necesaria para el metabolismo de la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y otros compuestos fenólicos en la síntesis de la melanina. Esto se evidencia por la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans* en el medio de TOC (Apartado 11.2.2).

Fenol-oxidasa

Procedimiento

1. Sembrar 2-3 colonias de un cultivo joven en el medio de TOC.
2. Incubar a 37 °C durante 3-5 días.

Interpretación

- El desarrollo de una pigmentación marrón oscura alrededor del crecimiento es característico de *C. neoformans*. (Figura 11.24).

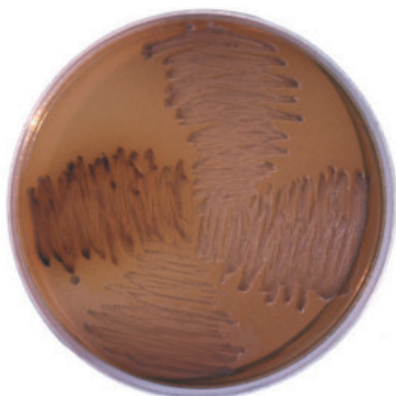


Figura 11.24. Prueba de la fenol-oxidasa (Medio de TOC). Producción de pigmento marrón oscuro por *C. neoformans*.

Nitrato-reductasa

Procedimiento

1. Pasar la punta de un aplicador por la superficie de 2-3 colonias aisladas de un cultivo de 48-72 h de crecimiento en cualquiera de los medios habituales. El hisopo inoculado se presiona con firmeza contra el fondo de un tubo vacío para que se desprendan los microorganismos contenidos en la fibra de algodón.
2. Incubar el tubo con el hisopo a 45 °C durante 10 min.
3. Sacar el hisopo y agregar al tubo 2 gotas de alfa-naftlamida y 2 gotas de ácido sulfanílico.
4. Reintroducir el hisopo en el tubo para que absorba los reactivos.

Interpretación

- El desarrollo inmediato de un color rojo indica una reacción positiva (Figura 11.23).

11.3.2. Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes

Auxonograma convencional

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien discos de papel absorbente empapados con el nutriente. Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas.

Medios de cultivo base. Se prepararan según la técnica habitual y no necesitan ajustar el pH. Se expenden deshidratados como medios base de levaduras. Los más utilizados son los siguientes:

1. Medio sin carbono. Sulfato amónico (5 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).
2. Medio sin nitrógeno. Glucosa (20 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).

Como fuente de carbono se puede ensayar todos los azúcares y alcoholes conocidos. Como substrato de nitrógeno se suele emplear peptona, asparagina, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio y aminoácidos diversos.

Auxonograma

Procedimiento

1. La levadura en estudio se siembra previamente en caldo glucosado de Sabouraud más cloranfenicol a 28 °C durante 48 h.
2. Agitar para mezclar el cultivo y tomar 1 ml como inóculo del medio sintético fundido. Enfriar a 50 °C, mezclar y verter en placa.
3. Preparar las soluciones estériles de los nutrientes, los azúcares al 10% y las sustancias nitrogenadas al 1%.
4. Una vez solidificado el agar, y con la ayuda de un tubo de cristal, agujerear 5-6 pocillos por placa. Sobre cada pocillo se vierten dos gotas de los distintos nutrientes en estudio.
4. ^{bis} Si se utilizan discos de papel absorbente, deben confeccionarse de distintos colores o rotularse previamente. Una vez esterilizados, y antes de su empleo, se empapan con dos gotas de las soluciones acuosas de los nutrientes (al 20% para los azúcares y al 2% para los substratos nitrogenados). Se secan en estufa y se aplican sobre el medio con pinzas estériles.
5. Incubar a 28 °C. (2-4 días).

Interpretación

- En la zona circulante a los pocillos o los discos, crecen abundantes colonias de levaduras si utilizan el nutriente correspondiente; por el contrario, no aparecen en los contornos de los no utilizados.
- La intensidad del cultivo periférico se expresa mediante cruces:
5 mm de radio (+), 5-10 mm (++) , >10 mm (+++).

Auxacolor®

La galería Auxacolor (Bio-Rad) es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH. La galería incorpora, además, una prueba de resistencia a la actidiona y otra para la detección de la actividad fenol-oxidasa de *C. neoformans* (Figura 11.25).

Sistema Uni-Yeast-Tek®

El sistema Uni-Yeast Tek (Remel) está constituido por una placa plástica con múltiples compartimentos que contienen un medio con agar para la asimilación diferencial de siete hidratos de carbono. También incorpora una cubeta central con agar harina de maíz-Tween 80 para determinar el crecimen-



Figura 11.25. Sistema Auxacolor® (Bio-Rad).

Auxacolor

Procedimiento

1. Realizar una suspensión, equivalente a 1 McFarland con un cultivo joven (24-48 h) de la levadura a identificar, en el vial con medio de suspensión facilitado por el fabricante.
2. Inocular la galería y cubrir con papel adhesivo.
3. Incubar a 30 °C durante 24-48 h (prolongar hasta 72 h si fuese necesario).

Interpretación

- El cambio de color (amarillo) se interpreta como crecimiento positivo para el azúcar en cuestión. Los 15 caracteres bioquímicos de la galería se agrupan en tripletes para obtener un código numérico. Para ello, se adjudica un valor de 1 para la posición 1ª del triplete, 2 para la 2ª y 4 para la 3ª. La identificación de la levadura se consigue comparando el código numérico resultante con los suministrados por el fabricante.

to micelial y la producción de clamidosporas. Además, está provisto de agar urea, agar para la asimilación y reducción de nitratos y de un caldo con extracto de carne al 2,6% (con 0,05% de glucosa) para realizar la prueba del tubo germinal (Figura 11.26).

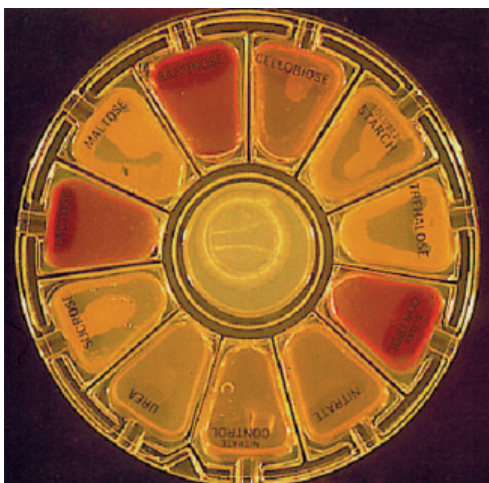


Figura 11.26. Sistema Uni-Yeast-Tek (Remel).

Uni-Yeast-Tek

Procedimiento

1. A partir de un cultivo de 24-48 h en medios habituales, realizar una suspensión en agua destilada estéril equivalente a 4 McFarland. Inocular cada uno de los compartimentos con una gota de esta suspensión.
2. El compartimiento con agar harina de maíz se siembra, con una pequeña porción de la colonia, haciendo dos o tres surcos paralelos con aguja de inoculación. Seguidamente, se coloca un cubreobjeto flameado sobre el área inoculada.
3. Incubar a 30-35 °C durante 2-7 días.

Interpretación

- La observación de cambio de color del azul al amarillo indica asimilación de los hidratos de carbono.
- El medio de nitrato se interpreta como reducción cuando el color azul original vira al color verde o verde azulado.
- La detección de hifas, blastosporas y clamidosporas en el agar harina de maíz se detecta mediante visualización con objetivo de 40X.

API 20C AUX®

La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi-sólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente (Figura 11.27). Permite identificar un total de 34 especies diferentes.

API 20C AUX

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
2. Transferir 100 µl (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas.
3. Llenar las cúpulas con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un nivel horizontal para generar resultados correctos.
4. Incubar a 30 °C durante 48-72 h.

Lectura e interpretación

- Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los diferentes nutrientes están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar. Sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico.
- La identificación debe hacerse mediante el Catálogo Analítico o el Programa Informático de Identificación suministrado por el fabricante.



Figura 11.27. Sistema API 20C AUX (bioMérieux).

11.3.3. Sistemas semiautomáticos

En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación [11].

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

Galería ID 32C®

La galería ID 32 C (bioMérieux) está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada (Figura 11.28). Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina.

El procedimiento para la inoculación de la galería, incubación e interpretación es similar al descrito para el sistema API 20 C AUX. La única diferencia es la posibilidad de realizar la lectura de la galería, de forma automática, mediante el sistema ATB Expression o mini API.

Sistema Vitek®

Las tarjetas Yeast Biochemical Card (YBC) del sistema Vitek (bioMérieux) permiten la identificación de organismos levaduriformes y afines de forma automatizada. Son unas tarjetas plásticas desechables que incluyen 30 celdillas: 26 pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles. Por otra parte, el sistema Vitek consta de un módulo con cámara de vacío para inoculación de las tarjetas, un lector/incubador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, un ordenador central y una impresora.

El sistema Vitek permite identificar 36 especies diferentes de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula*, 2 *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Prototheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

11.3.4. Sistemas automáticos

Sistema Vitek 2®

El sistema Vitek 2 (bioMérieux) es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levadu-



Figura 11.28. Galería ID 32C (bioMérieux).

Galería ID 32C

Procedimiento

1. Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en 2 ml de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
2. Transferir 250 μ l (5 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar.
3. **Inoculación manual:** Dispensar 135 μ l de la suspensión anterior en cada cúpula.
- 3^{bis}. **Inoculación automática:** Colocar sobre el portagalerías del inoculador ATB la galería y la suspensión en la ampolla de C Medium; el inoculador realizará automáticamente la homogeneización de la ampolla y el llenado de las cúpulas (135 μ l/cúpula).
4. Incubar a 30 °C. durante 24-48 h.

Lectura e interpretación

1. **Lectura visual:** Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0 (testigo negativo). Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los tests están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno en caso de positividad un valor diferente, 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar; sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico. La identificación se obtiene con el programa de identificación (Figura 11.29).
2. **Lectura automática con ATB Expression o mini API:** El lector busca en cada cúpula la presencia de crecimiento y transmite los datos al ordenador que, una vez procesados, propone la identificación de la especie.



Figura 11.29. Lectura visual e interpretación de los resultados de la galería ID 32C.

Sistema Vitek

Procedimiento

1. Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en un tubo con 1,8 ml de solución salina estéril, hasta conseguir una turbidez 2 de McFarland.
2. Introducir la tarjeta y la suspensión de levaduras en el módulo de llenado, para que la inoculación de la tarjeta se realice de forma automática.
3. Colocar la tarjeta inoculada en el módulo incubador (30 °C).
4. A las 24 h, la lectura de la turbidez de las celdillas se realiza automáticamente y se transfieren los datos al ordenador.

Interpretación

- Una vez que el patrón de las lecturas de turbidez se compara con los perfiles de la base de datos, se imprime la identificación del microorganismo.
- Una identificación aceptable es la que alcanza una confiabilidad $\geq 85\%$. Las levaduras identificadas con menos del 85% de confiabilidad deben ser evaluadas posteriormente valorando su morfología y otras pruebas suplementarias para lograr una identificación aceptable.

ras y organismos afines en tan sólo 15 h. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado.

Sistema Vitek 2

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a estudiar, preparar una suspensión en solución salina (0,45%), ajustándola a la escala 2 de McFarland.
2. La inoculación de las tarjetas, el sellado y la incubación (30 °C) se realiza de forma totalmente automatizada.
3. A las 15 h se realiza la lectura e interpretación de los resultados, también de forma automática.

El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.

Sistema Biolog YT MicroPlate®

El sistema Biolog YT MicroPlate (Biolog) permite la identificación de organismos levaduriformes mediante 94 pruebas bioquímicas, llegando a identificar hasta un total de 267 especies diferentes pertenecientes a 53 géneros.

Biolog YT MicroPlate

Procedimiento

1. Subcultivar cada levadura a identificar en agar BUY (Biolog) durante 24-48 h a 25 °C.
2. Realizar una suspensión, ajustándola a 44-51% de transmitancia.
3. Inocular cada pocillo de la MicroPlate.
4. Incubar la placa a 30 °C durante 24, 48 y 72 h.
5. Transcurrido el tiempo indicado, leer mediante lector de placa a 590 nm de longitud de onda.

Interpretación

- La lectura e interpretación se realiza automáticamente mediante un software de análisis y un sistema experto avanzado.

Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®

El Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring) es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados.

Rapid Yeast Identification Panel MicroScan

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven (18-24 h) en SDA, realizar una emulsión en 3 ml de agua destilada hasta conseguir la turbidez del Patrón MicroScan (aproximadamente 7-8 de la escala de McFarland).
2. Añadir, de forma automatizada, 50 μ l de la suspensión anterior a cada uno de los pocillos que contienen sustratos y a los pocillos controles.
3. Cubrir el panel e incubarlo en atmósfera de CO₂ a 35-37 °C durante 4 h.

Lectura e Interpretación

- Añadir los reactivos correspondientes a cada pocillo, incluyendo los controles.
- La lectura se puede realizar de forma visual o automatizada. Los resultados se convierten en un número de nueve dígitos y la identificación se realiza utilizando el libro de Códigos de biotipos para levadura de MicroScan.

11.3.5. Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas

RapID Yeast Plus System®

El RapID Yeast Plus System (Remel) es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies de levaduras (Figura 11.30).



Figura 11.30. Sistema RapID Yeast Plus System (Remel).

RapID Yeast Plus System

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven, preparar un inóculo con turbidez 3 de McFarland en 2 ml del Rapid Inoculation Fluid.
2. Inocular el panel con la suspensión anterior, inclinando y agitando el dispositivo para conseguir una distribución pareja del inóculo. Sellar la bandeja.
3. Incubar el panel a 30 °C durante 4-5 h.

Lectura e interpretación

- Leer directamente los primeros seis pocillos que contienen hidratos de carbono en busca de un cambio de color. Los pocillos 7-14 se leen después de agregar el reactivo "A" y los restantes tras agregar el reactivo "B" (Figura 11.31).
- Las reacciones se anotan en un formulario especial, obteniéndose un código de 8 dígitos. Este código se compara con la serie de perfiles numéricos incluida en el libro de compendio suministrado por el fabricante.

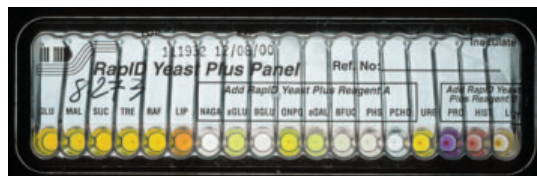


Figura 11.31. Lectura del Sistema RapID Yeast Plus System.

Fongiscreen 4H®

Fongiscreen 4H (Bio-Rad) es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras, permitiendo identificar en 4 h *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans* (Figura 11.32). La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo revelador.



Figura 11.32. Sistema Fongiscreen® (Bio-Rad).

Fongiscreen 4H

Procedimiento

1. Obtener una suspensión de la levadura a identificar a partir de un cultivo joven (24-48 h) en cualquiera de los medios habituales. La turbidez de la suspensión debe ser equivalente a la del testigo suministrado por el fabricante, aproximadamente 4 McFarland.
2. Inocular 3 gotas de la suspensión anterior en cada uno de los 6 pocillos de la microplaca y cubrir con el adhesivo suministrado por el fabricante.
3. Incubar a 37 °C durante 4 h.

Lectura e Interpretación

- La lectura se lleva a cabo mediante la adición de reactivos o por lectura directa.
- Los resultados se interpretan comparando el perfil obtenido con los perfiles específicos suministrados por el fabricante.

11.4. Identificación mediante criterios inmunológicos

11.4.1. Bichro-latex albicans®

Bichro-latex albicans (Fumouze) es un método para la identificación rápida de aislamientos *C. albicans* por aglutinación de partículas látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans* [10] (Figura 11.33).

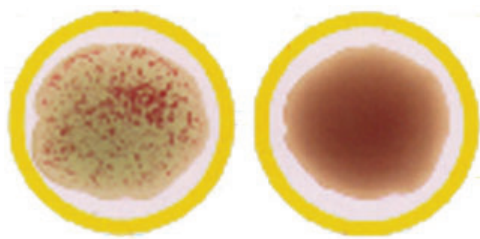


Figura 11.33. Sistema Bichro-latex albicans (Fumouze). El resultado positivo (aglutinación) se muestra en el panel de la izquierda.

Bichro-latex albicans

Procedimiento

1. Reconstituir un vial del agente disociante, con el volumen de agua destilada indicada.
2. Depositar 20 µl del agente disociante sobre un círculo del portaobjetos.
3. A partir de un cultivo de 24-48 h en SDA, u otro medio habitual, recoger 3-4 colonias de la levadura a identificar y emulsionarlas en el agente disociante.
4. Homogeneizar la suspensión del látex antes de su uso.
5. Añadir una gota del reactivo látex en el círculo.
6. Mezclar y extender con el agitador suministrado por el fabricante hasta que la suspensión sea homogénea.
7. Agitar en un agitador durante 5 min.

Interpretación

- Reacción positiva: Aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde: *C. albicans*.
- Reacción negativa: No se observa aglutinación, mantiene su color marrón.

11.4.2. Krusei-color®

Krusei-color (Fumouze) es un método para la identificación de aislamientos de *C. krusei* por aglutinación de partículas de látex, mediante un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno localizado en su pared (Figura 11.34).

El kit contiene un reactivo Krusei-color y 5 portaobjetos.



Figura 11.34. Sistema Krusei-color (Fumouze). El resultado positivo (aglutinación) se muestra en el panel de la izquierda.

Krusei color

Procedimiento

1. Resuspender el látex antes de su uso.
2. Por cada cepa a identificar dispensar una gota del reactivo de látex en el círculo del portaobjetos.
3. Mediante una pipeta Pasteur o un asa de platino, añadir 2 ó 3 colonias a la gota de látex y homogeneizar la emulsión.
4. Agitar en un agitador (5 min).

Interpretación

- **Reacción positiva:** Apariencia de aglutinación clara y evidente de color rojo indicativa de *C. krusei*.
- **Reacción negativa:** Ausencia de aglutinación. La suspensión mantiene su aspecto original.
- Ciertas cepas de otras especies (Ej. *C. parapsilosis*), pueden producir agregados de color blanco que no deben ser confundidos con los agregados rojos.

La prueba se realiza con dos reactivos distintos: a) bolas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular, y b) un agente disociante que permite la exposición al antígeno.

11.4.3. Bichro-Dubli®

Bichro-Dubli® (Fumouze) es un método para la identificación rápida de *C. dubliniensis*, basado en la coagulación de blastosporas de esta especie con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales, el cual permite la detección específica de un antígeno de *C. dubliniensis* localizado en la superficie de la célula.

La emulsión de colonias de *C. dubliniensis* en el reactivo Bichro-Dubli revela una coagulación, visible a simple vista, entre las blastosporas que portan el antígeno y las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales, aglutinados azules que progresivamente se extienden hacia la periferia, formando un borde azul alrededor de un área central roja/rosa (Figura 11.35).

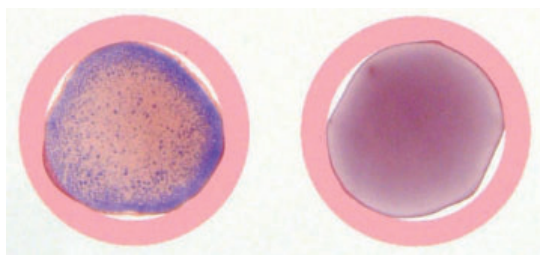


Figura 11.35. Sistema Bichro-Dubli (Fumouze).

Como resumen, en la Figura 11.36 se expone un esquema y un diagrama diagnóstico para la identificación de las levaduras más frecuentemente aisladas en la clínica.

Bichro-Dubli

Procedimiento

1. Dejar que el reactivo alcance la temperatura ambiente.
2. Por cada cepa a ensayar, distribuir 20 μ l de reactivo previamente homogeneizado en el círculo de una tarjeta.
3. Coger, con una pipeta pasteur o asa de platino, 2-3 colonias de la levadura.
4. Emulsionar las colonias dentro de la gota de reactivo y extenderla en el área completa del círculo, hasta que la suspensión sea homogénea.
5. Balancear suavemente con un movimiento de rotación y observar la presencia o ausencia de aglutinación entre 3 a 5 min.

Interpretación

- Reacción positiva: presencia de aglutinados coloreados de azul que progresivamente se extienden hacia la periferia, formando un borde azul alrededor de un área central roja/rosa/purpura/violeta.
- Reacción negativa: No aglutinación (la suspensión conserva su aspecto homogéneo original)
- Para detectar una posible asociación *C. albicans* / *C. dubliniensis*, se recomienda realizar varios test de un cultivo.
- Ciertas cepas de levaduras no-*C. dubliniensis* (Ej. *C. parapsilosis*) pueden producir agregados de color blanco que no deben ser confundidos con los agregados azules.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

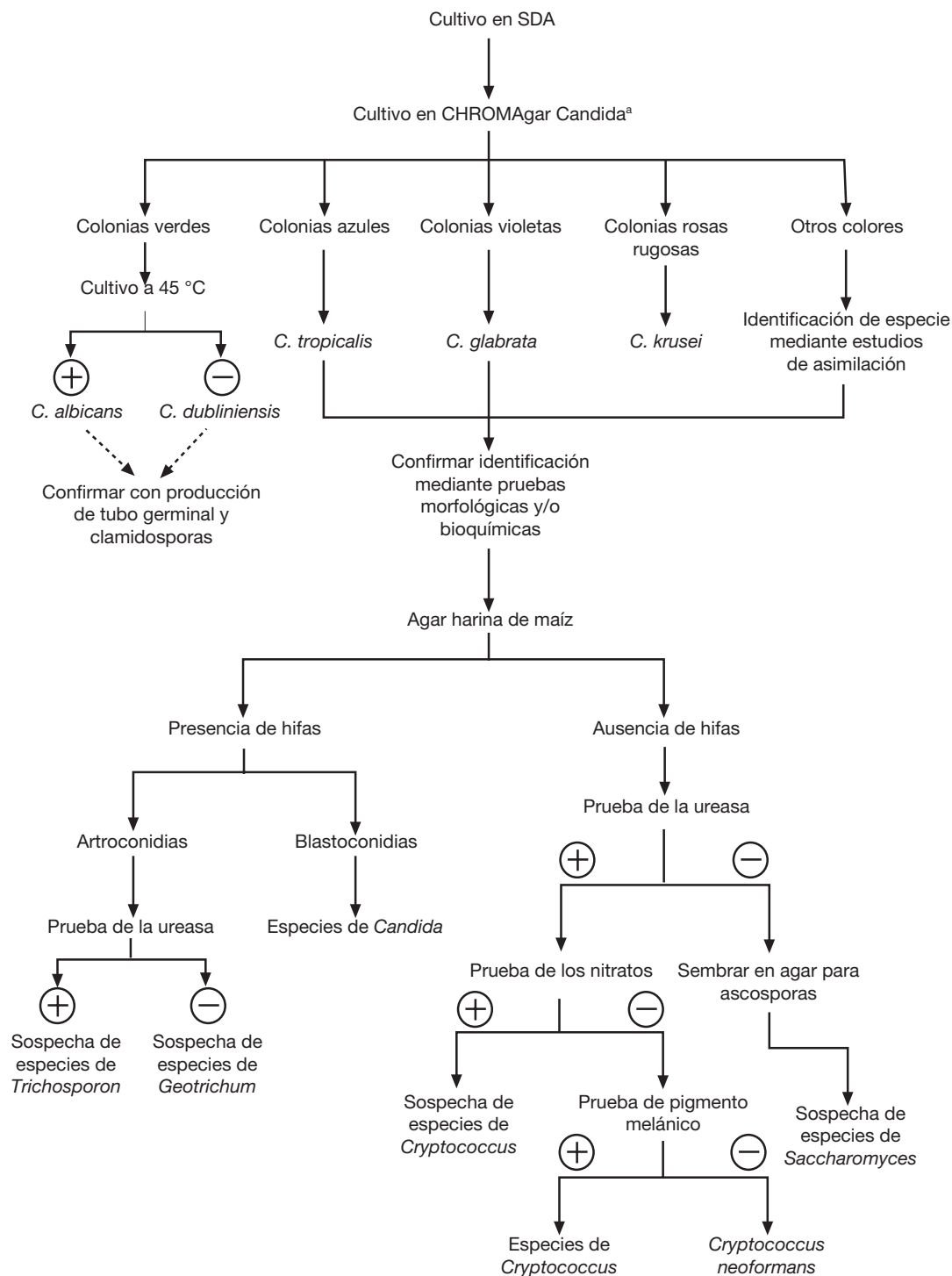


Figura 11.36. Esquema de identificación y diagrama diagnóstico para las levaduras más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. a: En muestras con alta sospecha de micosis por hongos levaduriformes se puede utilizar como medio de aislamiento primario. b: Si son colonias rojas o anaranjadas en el medio de SDA se trataría de especies de *Rhodotorula* o *Sporobolomyces*, respectivamente.

11.5. Identificación de levaduras lipófilas

Debido a su requerimiento de ácidos grasos, las levaduras lipófilas no pueden ser identificadas con los sistemas y medios habituales para otras levaduras, por lo que su identificación merece un comentario diferenciado.

Durante mucho años se ha venido utilizando el binomio *Malassezia furfur* para designar la fase micelial de las levaduras lipófilas encontradas en la piel humana, en tanto se reservaban los términos *Pityrosporum ovale* y *Pityrosporum orbiculare* para los dos tipos morfológicos de la fase levaduriforme. La taxonomía del género *Malassezia* ha sido recientemente revisada y comprende en la actualidad siete especies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae* [13,14].

Es factible recuperar estos microorganismos en cultivos en SDA o en agar sangre de carnero al 5% si los cubrimos con ácidos grasos de cadena larga, como los contenidos en el aceite de oliva. Tras incubación a 35 °C durante 2 a 4 días se desarrollan unas colonias de consistencia cremosa muy parecidas a las producidas por las otras levaduras.

Además de los medios suplementados, también se puede utilizar medios específicos para el aislamiento de las especies de este género, como son el medio Agar de Dixon modificado y el de Leeming (Capítulo 3). A partir de su crecimiento en estos medios, la identificación de las especies de *Malassezia* se lleva a cabo mediante criterios microscópicos y bioquímicos [13]. Entre estos últimos: producción de catalasa; crecimiento en SDA no suplementado con lípidos a 32 °C; crecimiento en Agar Dixon modificado a 32 °C, 37 °C y 40 °C; utilización de Tween 80, Tween 40 y Tween 20 (Tabla 11.2).

Tabla 11.2. Características fisiológicas de las especies de *Malassezia*.

Especie	Catalasa	SDA ^a	mDixon ^b			Tween		
			32 °C	37 °C	40 °C	80 (0,1%)	40 (0,5%)	20 (10%)
<i>Malassezia furfur</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Malassezia sympodialis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Malassezia globosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Malassezia obtusa</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Malassezia restricta</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Malassezia slooffiae</i>	+	-	+	+	+	-	+	+

a: crecimiento en agar Sabouraud sin ningún suplemento lipídico
b: crecimiento en agar Dixon modificado a 32, 37 y 40 °C

Nuestro más sincero agradecimiento a D^a Josefa Gonzalez López, Técnico Especialista de Laboratorio, por la ayuda prestada en la identificación de tantas, tantas y tantas levaduras, y al Dr. Esteban Tarrada Merino por la ayuda informática y la realización iconográfica de este Capítulo.

Referencias

- Berardinelli C, Opheim DJ. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1994; 22: 861-862.
- Fleming III WH, Hopkins DM, Land GA. New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1977; 5: 236-243.
- Casal M, Linares MJ. Comparisons of six media for production of chlamidospore by *Candida albicans*. Mycopathologia 1981; 76: 125-128.
- Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Micología. En: Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Panamericana Ed. Med. 1999: 955-1037.
- Feo M, De Pacheco A. *Candida albicans*: La leche en la producción de clamidosporas. Am Microbiol 1976; 18: 23-24.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2093-2095.
- Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 85-89.
- Freydière AM, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, Monerau F, Vandenesch F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. J Clin Microbiol 2003; 41: 3861-3863.
- Pemán J, Aparisi N, García-Esteban C, Gobernado M. Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 82-84.
- Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001; 39: 9-33.
- Quindós G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J. Evaluation of Bichro-latex Albicans a new method for rapid identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1263-1265.
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-110.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355.