

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS (BIOCEN)

Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado

Tamara Lobaina Rodríguez,¹ Raisa Zhurbenko,² Claudio Rodríguez Martínez,³ Yordania Zayas Ruíz⁴ y Ailen Rodríguez Rodríguez⁵

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: las especies de *Candida* son responsables de la mayoría de las infecciones micóticas oportunistas. La identificación rápida y precisa de las levaduras es importante no solo para la aplicación del tratamiento efectivo de la infecciones, sino para prevenir la emergencia de cepas con resistencia a las drogas. Hasta ahora, los procedimientos para su identificación se basan en varias pruebas, incluida la habilidad de asimilar azúcares como única fuente nutricional. **OBJETIVO:** el propósito del presente estudio fue evaluar una modificación de la prueba de auxonograma de sustancias carbonadas, utilizada para la identificación de especies de *Candida* en un período de 24 a 48 h. **MÉTODOS:** el procedimiento, basado en la asimilación de sustancias carbonadas (auxonograma), fue evaluado para la identificación de las especies de *Candida* de mayor relevancia clínica. Un total de 164 cepas del género *Candida* fueron incluidas en el estudio, de ellas 156 aisladas a partir de muestras clínicas y otras 8 cepas de referencia provenientes del cepario central de BioCen (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. kefyr*). En el procedimiento se utilizó una suspensión estandarizada de levadura, que se inoculó por el método de vertimiento en placa en un medio libre de carbono, esterilizado en autoclave. Sobre la mezcla (60 mL de medio de cultivo y 3 mL de suspensión microbiana) solidificada se dispensaron 10 µL de varias soluciones de carbohidratos esterilizadas por filtración en diferentes puntos del medio de cultivo. La asimilación del compuesto fue observada como una zona de crecimiento alrededor del punto de distribución del carbohidrato después de 24 a 48 h de incubación. **RESULTADOS:** todas las especies de *Candida* fueron correctamente identificadas por el método de auxonograma modificado y se logró 100 % de concordancia con la técnica de Wickerham. **CONCLUSIONES:** el método alternativo para la prueba de auxonograma del carbono es simple, confiable, más rápido y más fácil de interpretar que el de Wickerham.

Palabras clave: asimilación de carbohidratos, auxonograma, identificación de levaduras, *Candida*.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas son consideradas un suceso creciente y de preocupación al nivel mundial.^{1,2} El aumento de la incidencia y la gravedad de las micosis está relacionado con la aparición de enfermedades debilitantes, como

son el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), el uso cada vez más frecuente de antineoplásicos e inmunosupresores potentes para el tratamiento del cáncer, receptores de transplantes, enfermedades autoinmunes y la desnutrición, entre otros factores, lo que ha traído como consecuencia el incremento de la población en riesgo.^{3,4}

¹ Ingeniera Química. Máster en Ciencias en Fisiología Vegetal. Investigadora Auxiliar. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Ciudad de La Habana, Cuba.

² Doctora en Ciencias de los Alimentos. Ingeniera Tecnóloga. Investigadora Titular. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Doctor en Ciencias Técnicas. Ingeniero Tecnólogo. Investigador Titular. BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Técnico Innovador de Primer Nivel. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵ Ingeniera Química. Aspirante a Investigador. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

En este escenario, las micosis profundas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Las especies del género *Candida* son las de mayor incidencia, siendo *Candida albicans* comúnmente la más aislada. No obstante, han emergido otras especies, como, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* (*Torulopsis*), *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Candida kefyr*, con marcada importancia.^{5,6} Aunque las razones de esta emergencia no están del todo definidas, se ha sugerido que un factor importante podría ser la carencia relativa de sensibilidad a fluconazol y otros azoles, administrados corrientemente para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Se ha observado que *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensibles a fluconazol que *C. albicans*.^{4,7-10} Es por ello que la identificación de los aislamientos fúngicos hasta el nivel de especie en un laboratorio clínico requiere del empleo de procedimientos rápidos y precisos, porque esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se disponga de los resultados de sensibilidad *in vitro*.^{11,12}

Entre otras razones, que justifican la importancia de identificar estos organismos en cuanto a género y especie, se encuentran las epidemiológicas, porque la introducción de la identificación de la levadura como rutina en el laboratorio de micología permite ampliar el conocimiento de estas especies desde los puntos de vista clínico y micológico.^{5,6}

De las pruebas fisiológicas y bioquímicas se han derivado los ensayos de asimilación (auxonograma - degradación aerobia) y fermentación (zimograma - degradación anaerobia) de carbohidratos para la identificación de levaduras.¹³ Patrones de asimilación y fermentación de muchos géneros y especies se encuentran disponibles en la literatura, sin embargo, se seleccionan con mayor fiabilidad las pruebas de auxonogramas, por causa de la existencia de ciertos carbohidratos que forman parte de la estructura celular de estos microorganismos, los cuales podrían revelar resultados falsos positivos en la prueba de fermentación de determinadas sustancias carbonadas.^{13,14}

En la actualidad se cuenta con diversos métodos, los cuales varían en tiempo de ensayo,

especificidad, sensibilidad, costos, etcétera.^{11,12} Varios sistemas miniaturizados, estandarizados y automatizados existen en el mercado, como, API 32C (bioMérieux, Francia),¹⁵ *Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®* (Dade Behring),¹⁶ *Sistema Vitek* (bioMérieux, Francia),^{15,17} entre otros, con la finalidad de simplificar y acelerar la identificación de los hongos. No obstante, estos poseen elevados precios, elemento que limita su uso en la rutina del laboratorio clínico.¹⁸

Entre los procedimientos manuales más difundidos que emplean medios agarizados se conoce la técnica de Beijerinck, sobre la cual se basa la modificación propuesta en el presente trabajo.¹⁹⁻²¹ La desventaja de este procedimiento consiste en la utilización directa de las sustancias carbonadas, las cuales pueden aportar contaminantes microbianos al no ser tratadas por procedimientos estériles, además de ser incorporadas sin facilitar su disolución y afectar con ello su difusión en el medio. También algunas de estas sustancias poseen baja solubilidad, por lo que no se garantiza la consistencia de las concentraciones entre diferentes ensayos. Esta técnica, así como el medio de cultivo de Beijerinck, han sufrido múltiples modificaciones en el tiempo, con la finalidad de simplificar el procedimiento, mantener su efectividad y obtener una mejor precisión de la prueba.²⁰⁻²²

El propósito del presente trabajo fue evaluar una modificación de la prueba de asimilación de sustancias carbonadas (auxonograma), más rápida, consistente y económica, para la identificación de las especie de *Candida* de mayor incidencia en la clínica.

MÉTODOS

Material biológico

Fueron incluidas en el estudio 164 cepas de *Candida* sp. De ellas, 8 cepas de referencia procedentes del Cepario Central de BioCen, utilizadas como microorganismos controles, tipificadas como: *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 17111, *C. tropicalis* CT-UH1, *C. parapsilosis* CP-UH1, *C. kefyr* CKF-UH1, *C. glabrata* CG-C2, *C. guilliermondii* y *C. krusei* CKR-UH1. Las 156 restantes se aislaron de muestras clínicas de los pacientes con infecciones fúngicas.

Identificación primaria

Las cepas aisladas de las diferentes muestras de pacientes habían sido conservadas utilizando el método de Castellani en agua destilada estéril a temperatura ambiente,^{23,24} se reaislaron en agar dextrosa de Sabouraud y se obtuvo cultivo puro de cada especie a identificar. Se realizó la evaluación macroscópica de los cultivos por medio de la observación visual, se examinó el aspecto de las colonias sobre la superficie del medio, como son color, textura, topografía de la superficie y bordes, con el objetivo de determinar la presencia de características del género *Candida*. Para detectar presuntamente la presencia de *C. albicans*, se utilizó la prueba de tubo germinativo en suero de conejo estéril, por el lapso de 2 a 3 h a 37 °C.¹³

Medios de cultivo y reactivos

Se utilizó el medio de cultivo agar dextrosa de Sabouraud (BioCen)²⁵ para el cultivo de las cepas en estudio y caldo triptona soya (BioCen)²⁵ para verificar la esterilidad de las soluciones de carbohidratos.

Para la prueba de asimilación de carbohidratos se formuló un medio de cultivo sintético libre de fuentes de carbono (MCS), con la composición siguiente: sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 5,0 g; hidrógeno fosfato de potasio $[\text{K}_2\text{HPO}_4]$ 0,45 g; di-hidrógeno fosfato de potasio $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ 0,31 g; hidrógeno fosfato de sodio $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ 0,92 g; cloruro de sodio $[\text{NaCl}]$ 0,1 g; cloruro de calcio $[\text{CaCl}_2]$ 0,05 g; sulfato de magnesio heptahidratado $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ 0,2 g; L-histidina monoclóhidrato 0,005 g; L-triptófano 0,02 g; L-metionina 0,02 g; azul bromotimol 0,04 g y agar 20 g. El pH del medio se ajustó a 6,6 con la ayuda del pH-metro (PHM 83 AUTOCAL-Dinamarca) y se esterilizó en autoclave (GETINGE, Francia) a un régimen de temperatura de 121 °C durante 15 min.

Al evaluar el método alternativo para la prueba de auxonograma se prepararon, para cada especie microbiana a identificar, 2 matraces de Erlenmeyer con 60 mL de MCS. Se fundieron y se esterilizaron en autoclave y después fueron colocados en baño con control automático de temperatura (Termo Haake DC-10, Alemania); se mantuvieron de 45 a 50 °C por un máximo de 2 h.

Se utilizaron para la preparación de las soluciones acuosas (p/p) las sustancias carbonadas siguientes: glucosa (GLU) (Merck) 20 %, xilosa (XIL) (Merck) 20 %, adonitol (ADO) (Merck) 20 %, galactosa (GAL) (Applichem) 25 %, inositol (INO) (Merck) 20 %, sorbitol (SOR) (FLUKA) 20 %, metil alfa-D-glucopiranosido (MDG) (FLUKA) 20 %, celobiosa (CEL) (Applichem) 20 %, lactosa (LAC) (Applichem) 20 %, maltosa (MAL) (Merck) 20 %, trehalosa (TREH) (Merck) 20 %, melecitosa (MLZ) (FLUKA) 20 %, rafinosa (RAF) (Merck) 25 % y ácido láctico (AcL) (Applichem) 20 %. Cada sustrato fue disuelto en agua desionizada y filtrado a través de unidades de filtración desechables Nalgene (0,45 μm , tamaño del poro) (Nalge Co., Rochester, N.Y.). Las soluciones fueron almacenadas en tubos de cultivo a temperatura entre 4 y 8 °C hasta su uso.

Comparación con el método estándar de Wickerham

Se utilizaron las cepas certificadas del cepario central de BioCen, las cuales poseen una pureza e identidad probadas; fueron evaluadas con el método auxonograma descrito a continuación y la técnica estándar de Wickerham, la cual se basa en el empleo de un medio líquido sin agitación.²⁶ El medio de asimilación (medio de Lodder): sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 5 g; fosfato de potasio monobásico $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ 1 g; sulfato de magnesio heptahidratado $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ 0,5 g; agua destilada 1 L, se distribuyó a razón de 0,5 mL en tubos de cultivo y se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 min. Una solución acuosa 6 % de cada carbohidrato a evaluar, fue esterilizada por filtración y se adicionó 0,5 mL a cada tubo. Un tubo que contenía solo caldo y no carbohidratos, fue utilizado como control negativo para cada especie. Cada tubo fue inoculado con 0,1 mL de suspensión microbiana estandarizada conforme a la escala No. 1 MacFarland (300×10^6 UFC/mL).

Los tubos fueron incubados a 25 °C y observados durante 7 d. La asimilación del compuesto carbonado se consideró positiva cuando se apreciaba mayor turbidez en el tubo que contenía el carbohidrato que en el tubo control.^{26,27} Los aislados, que presentaron conflictos de reacción para determinados carbohidratos en particular, fueron reevaluados en ambos métodos de asimilación.

Descripción del método auxonograma evaluado

A partir de las colonias aisladas de las cepas de *Candida*, después del cultivo de 24 a 48 h, se prepararon suspensiones estandarizadas en 9 mL de solución salina estéril que alcanzaron una turbidez similar al tubo 2 del patrón de MacFarland (600×10^6 UFC/mL). Los matraces de Erlenmeyer que contenía 60 mL de MCS estéril fueron inoculados cada uno con 3 mL de suspensión microbiana estandarizada. Se agitaron para homogeneizar la mezcla y se distribuyó todo este volumen en una placa Petri de 150×15 mm estéril. Las placas se dejaron solidificar en una superficie plana nivelada y logró alcanzar el medio distribuido una altura entre 4 y 5 mm.

Una vez solidificado el medio, se rotuló el fondo de las placas de Petri con las siglas asignadas a cada una de las sustancias a evaluar. Con el asa de inoculación estéril se realizaron cortes profundos en el agar, distribuidos a una distancia mínima entre uno y otro de 2 cm, y con ayuda de una pipeta semiautomática se introdujo en la incisión un volumen de 10 μ L de la solución del compuesto carbonado estéril. Todas las soluciones de carbohidratos fueron inoculadas en caldo triptona soya, para comprobar su esterilidad y evitar resultados falsos positivos.

Posteriormente, las placas se colocaron invertidas, en una estufa a 35 ± 2 °C. Cada 24 h se procedió a su observación, hasta un máximo de 72 h; se reportó la asimilación de las sustancias

carbonadas, al evidenciarse una zona circular de mayor densidad de crecimiento alrededor del sitio en el agar donde se aplicó la sustancia a estudiar.

RESULTADOS

Entre las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a las cepas de referencia de *Candida*, se ensayó la capacidad de asimilar 14 compuestos carbonados, se comparó el método estándar de Wickerham y el método de auxonograma modificado, cuyos resultados se muestran en la tabla 1.

La lectura inicial realizada a las 72 h de incubación mostró una concordancia de las reacciones de asimilación positivas entre ambos procedimientos de 96,5 %, porque 2 (3,5 %) de ellas resultaron dudosas, al ser interpretadas por el técnico. Las discrepancias fueron para el adonitol y metil alfa-D-glucopiranosido, en las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*, respectivamente; el método de Wickerham resultó responsable de las lecturas inexactas, las cuales fue preciso repetir.

La concordancia final (a los 7 d de lectura) entre ambos métodos fue de 100 % para todas las cepas de *Candida* evaluadas frente a las sustancias carbonadas seleccionadas. Es importante destacar que en un período máximo de 48 h es posible realizar la interpretación de los resultados de las reacciones de asimilación de las sustancias carbonadas, empleando el método modificado de auxonograma propuesto, mientras que con el método estándar de Wickerham se requieren 7 d (168 h).

TABLA 1. Resultados de asimilación del compuesto carbonado del método modificado propuesto para la prueba de axonograma y la técnica de Wickerham

Levadura	^a Asimilación de:														Total
	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TREH	MLZ	RAF	AcL	
<i>C. guilliermondii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	11
<i>C. tropicalis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. albicans</i> ATCC 17111	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. parapsilosis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1*	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	9
<i>C. kefyri</i>	1/1	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	5
<i>C. glabrata</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	2
<i>C. krusei</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2
Total	8/8	5/5	5/5	6/6	0/0	5/5	5/5	2/2	1/1	5/5	6/6	3/3	2/2	4/4	57

Glucosa: GLU, xilosa: XIL, adonitol: ADO, galactosa: GAL, inositol: INO, sorbitol: SOR, metil alfa-D-glucopiranosido: MDG, celobiosa: CEL, lactosa: LAC, maltosa: MAL, trehalosa: TREH, melecitosa: MLZ, rafinosa: RAF, ácido láctico: AcL. ^a los datos son expresados como respuesta positiva del carbohidrato asimilado por el método alternativo/respuesta positiva del carbohidrato asimilado por la técnica de Wickerham; * reacción dudosa.

El cultivo de las cepas de *Candida* spp., aisladas de las muestras clínicas en el medio agar dextrosa de Sabouraud, permitió realizar una identificación primaria teniendo en cuenta sus características macromorfológicas. Se evidenció la presencia de colonias completas de diámetro entre 1 y 3 mm, ligeramente abombadas o aplanadas, de consistencia cremosa, la mayoría lisas y algunas rugosas, brillosas u opacas, de color blanco a crema, que no desarrollaron micelio aéreo y presentaron un olor dulce propio del género *Candida*.

La evaluación de la producción del tubo germinativo, estructura que identifica presuntamente la especie *C. albicans*, reveló que de las 156 cepas evaluadas su formación se evidenció en 39,7 % (n= 62). Estas estructuras se identificaron al microscopio (X10) como una extensión a partir de la célula de la levadura, semejante a las hifas, y sin constricción en su punto de origen. Este resultado posibilita inferir la presencia de 62 cepas de *C. albicans*, pero no aporta elementos que permitan la identidad de los demás aislamientos.

La aplicación del procedimiento de auxonograma modificado permitió realizar la identificación de todas las cepas de *Candida* spp. aisladas, según los patrones de asimilación de las sustancias carbonadas, coincidentes con los referidos en las tablas de estudios taxonómicos clásicos.^{13,14, 26}

En la figura 1 se muestra la distribución de especies de *Candida* identificadas, donde se aprecia la mayor presencia de *C. albicans* que alcanza 40 % (n= 62) entre las muestras evaluadas. Las demás aparecen distribuidas en 60 % restante, reportándose en el orden de frecuencia de identificación siguiente: *C. parapsilosis* 24 % (n= 38), *C. guilliermondii* 16 % (n= 25), *C. tropicalis* 10 % (n= 15), *C. glabrata* 6 % (n= 10), *C. krusei* 3 % (n= 4) y *C. kefyr* 1 % (n= 2).

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de las reacciones positivas de asimilación de compuestos carbonados por las cepas de *Candida* después de 48 h de incubación a 35 ± 2 °C, utilizando el método alternativo propuesto.

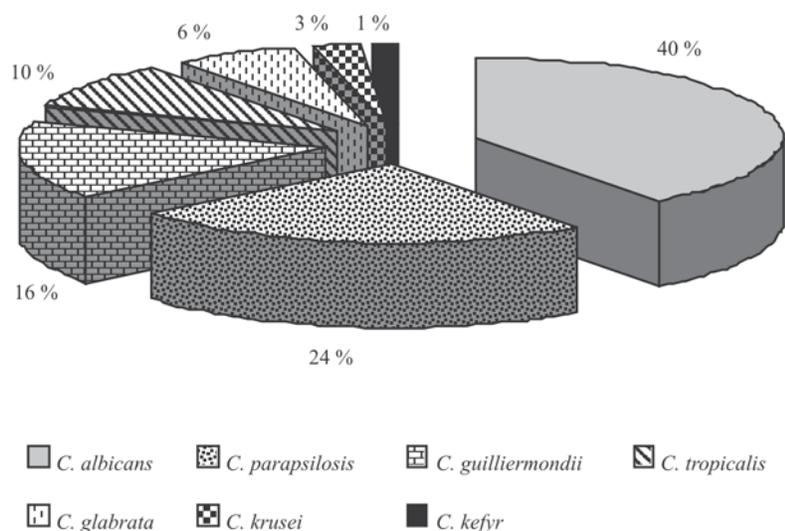


Fig. 1. Distribución de especies de *Candida* aisladas de las muestras clínicas evaluadas.

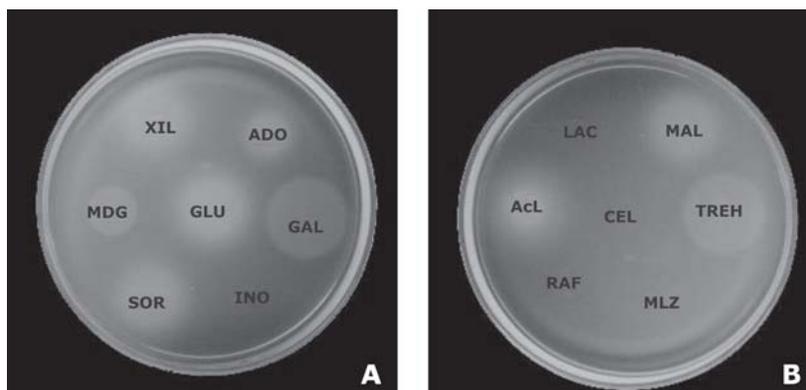
TABLA 2. Porcentaje de las reacciones positivas de asimilación de compuestos carbonados después de las 48 a 72 h de incubación a 35 ± 2 °C obtenidos, utilizando el método modificado propuesto

Levadura	No.	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TREH	MLZ	RAF	AcL
<i>Candida albicans</i>	62	100	100	40	100	0	100	100	0	0	100	97	5	0	95
<i>Candida parapsilosis</i>	38	100	97	82	100	0	95	66	0	0	100	84	100	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	25	100	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100	0
<i>Candida tropicalis</i>	15	100	100	80	100	0	100	100	100	0	100	100	100	0	0
<i>Candida glabrata</i>	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Candida kefyr</i>	2	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100

Glucosa: GLU, xilosa: XIL, adonitol: ADO, galactosa: GAL, inositol: INO, sorbitol: SOR, metil alfa-D-glucopiranosido: MDG, celobiosa: CEL, lactosa: LAC, maltosa: MAL, trehalosa: TREH, melecitosa: MLZ, rafinosa: RAF, ácido láctico: AcL.

A: GLU-glucosa (+), XIL- xilosa (+), ADO-adonitol (+), GAL-galactosa (+), INO-inositol (-), SOR-sorbitol (+), MDG-metil alfa-D-glucopiranosido (+).
 B: CEL-celobiosa (-), LAC-lactosa (-), MAL-maltosa (+), TREH-trehalosa (+), MLZ-melecitosa (-), RAF-rafinosa (-) y AcL-ácido láctico (+); +: respuesta positiva; -: respuesta negativa.

Fig. 2. Resultados de la observación de una cepa aislada evaluada según el método propuesto para la asimilación de sustancias carbonadas.



De forma general se aprecia que todas las especies fueron capaces de asimilar la glucosa y ninguna de ellas utilizó el inositol, elemento particular para identificar el género *Cryptococcus*.^{2,3} *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, son las especies que mostraron una mayor capacidad para asimilar las sustancias carbonadas evaluadas. Se comprobó su crecimiento frente a la xilosa, galactosa, sorbitol, maltosa y trehalosa, además de adonitol y metil-alfa-D-glucopiranosido. No obstante, de estos 2 últimos compuestos, es necesario señalar que para el caso de la asimilación del adonitol fue inferior a 80 % para las especies *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, y 40 % para *C. albicans*. La asimilación del metil-alfa-D-glucopiranosido se encontró por debajo de 65 % para la identificación de *C. parapsilosis*.

Las especies que mostraron menor capacidad de asimilación de compuestos carbonados fueron *C. glabrata* y *C. krusei*, mostrando su desarrollo solo frente a la trehalosa (80 %) y al ácido láctico (100 %), respectivamente.

De forma general, se puede valorar que la utilización del ácido láctico es característica de las especies *C. albicans*, *C. krusei* y *C. kefyri*. Sin embargo, la asimilación de la melecitosa es común en *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, pero se manifiesta, a su vez, que la celobiosa es asimilada solo por las 2 últimas especies; se descarta *C. guilliermondii*, por la asimilación de la rafinosa. Este compuesto es también utilizado por *C. kefyri*, sin embargo, en esta especie es propia la utilización de la lactosa.

De las evaluaciones realizadas a una de las cepas estudiadas, se muestra una imagen en la figura 2. La lectura de los resultados se realizó mediante la observación visual de la placa a trasluz, y la zona de turbiedad alrededor del punto de incisión en el cual se colocó la fuente de carbono, se consideró como la asimilación de la sustancia carbonada y, por tanto, el crecimiento del microorganismo.

DISCUSIÓN

La evaluación de la concordancia entre las reacciones positivas del procedimiento de auxonograma modificado y el método estándar de Wickerham mostró resultados satisfactorios. Estos procedimientos tienen su basamento en que los hongos son organismos quimiótrofos, que degradan los nutrientes del medio exterior, como son 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 han permitido definir el patrón catabólico que puede presentar un determinado género o especie.²⁷

Es importante apuntar algunas experiencias encontradas, al comparar ambos métodos de asimilación y en especial al utilizar el método estándar de Wickerham, que pueden influir en la lectura e interpretación inexacta de los resultados. Una de ellas está relacionada con la preparación del medio de cultivo líquido, donde la calidad del agua es

un elemento fundamental para garantizar la total disolución del conjunto de sales inorgánicas que componen la formulación. A su vez, en el proceso de esterilización por autoclave del medio de cultivo, acontece un conjunto de reacciones que pueden dar lugar a la formación de complejos insolubles, limitando la disponibilidad de macronutrientes y micronutrientes necesarios para cubrir las necesidades básicas en el desarrollo de las especies de levaduras.^{13,25,28}

El medio de cultivo preparado debe ser totalmente transparente e incoloro, para evidenciar mediante la turbidez la asimilación del compuesto carbonado y, a su vez, el crecimiento del microorganismo. La aparición de precipitados en el fondo del tubo antes de ser inoculado, puede ser interpretado como una reacción falsa positiva.^{20,21,26} Este fenómeno ha sido reportado por varios autores y hoy día se recomienda efectuar el proceso de esterilización por filtración del medio de cultivo líquido, utilizando filtros con membranas de acetato de celulosa con porosidad de 0,2 μm para que no se formen estos sedimentos, con ello se garantiza la disponibilidad de todos los ingredientes de la composición y se facilita la lectura e interpretación de los resultados.²⁶⁻²⁸

Otro aspecto que influye en la aparición de precipitados del medio utilizado en el método de Wickerham, es su almacenamiento prolongado en el refrigerador, dado por la pérdida considerable del contenido de agua y por ende una mayor concentración de las sales que forman parte de la composición.

Por otra parte, al igual que en otros métodos para la identificación de levaduras basados en la asimilación de carbohidratos, como API 20C AUX y el ID 32C (bioMérieux, Francia),^{12,15} la formulación del medio de cultivo propuesto contiene, además de las sales inorgánicas comunes en la base, aminoácidos esenciales, entre ellos, histidina, metionina y triptófano, en concentraciones de 0,005 a 0,02 g/L de medio de cultivo, los cuales favorecen la adaptación de las especies de levaduras en el medio en un menor período, porque proveen los nutrientes necesarios para su desarrollo. A su vez, la composición puede ser tratada por esterilización en autoclave, sin la formación de precipitados indeseables.

La conservación del medio preparado en refrigeración manifiesta una menor pérdida de agua,

porque está ligada al gel de agar y, por tanto, retenida por la estructura del medio de cultivo sólido y, por esta razón, puede ser almacenado durante períodos prolongados (2 a 3 semanas) sin sufrir cambios sustanciales en su formulación.

Por último, la técnica de Wickerham se efectúa sin agitación y se conoce que las levaduras requieren de condiciones aerobias para su adecuado desarrollo, por ello tiene una especial atención valorar la cantidad de medio de cultivo que se distribuye (0,5 mL) en correspondencia con las dimensiones del tubo, porque esto influye significativamente en la aereación del cultivo y, por consiguiente, en su desarrollo. Sin embargo, el uso de placas de Petri en el método modificado, facilita el intercambio de oxígeno del cultivo y minimiza el problema de la interpretación de la reacción positiva de asimilación.

Al comparar el método estándar con el procedimiento de auxonograma propuesto, se encontró que un conjunto de factores influyen significativamente en la interpretación de los resultados, como la preparación del medio de cultivo, su composición, almacenamiento y las condiciones de incubación, con diferencias sustanciales que posibilitan la interpretación de las reacciones en un menor período de tiempo y con mayor facilidad en el método propuesto.

Según la metodología convencional, la identificación primaria de toda especie de levadura comienza con la evaluación de criterios macroscópicos.^{22,27} El morfotipo observado en las colonias de los aislamientos clínicos permitió, de forma presuntiva, considerar que pertenecían al género *Candida*. De forma general, no desarrollan micelio aéreo, a pesar de que pueden aparecer prolongaciones en los bordes y superficie de las colonias, porque la textura rugosa descrita para el caso de *C. krusei*, *C. tropicalis* y algunas *C. parapsilosis*. Este elemento es característico de levaduras de los géneros *Geotrichum*, *Trichosporon* o *Blastoschizomyces*.^{13,27}

Entre otras características observadas en las colonias aisladas se describió su tamaño y color, los cuales fueron esenciales para descartar su ubicación entre los géneros *Cryptococcus*, que desarrollan colonias de consistencia mucóide, y el género *Rhodotorula* cuyas colonias son de color rojo-naranja a naranja, resultantes de la producción de carotenoides.^{3,13,22}

Es común realizar la identificación de *C. albicans* mediante la técnica de tubo germinativo, una prueba simple, rápida y económica.¹³ Sin embargo, los inconvenientes de esta prueba están dados a que *C. dubliniensis*, especie de características fenotípicas casi idénticas, también produce tubos germinales, por lo que esta prueba no discrimina ambas especies, solo puede orientar en la identificación y es necesario complementarla con otros estudios.^{29,30} Del mismo modo, pueden obtenerse resultados falsos positivos en otras especies del género como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* que producen estructuras semejantes a un tubo germinativo.^{13,14,30} Así, para identificar los aislados falsos positivos y falsos negativos, se recomienda utilizar pruebas adicionales, como son la producción de clamidosporas, el uso de medios cromogénicos, la asimilación de azúcares, la termotolerancia a temperaturas entre 42 y 45 °C, la resistencia frente a la cicloheximida, y en caso necesario, la genotipificación.^{13,14,28,30}

Al analizar los resultados obtenidos, el método de auxonograma del carbono propuesto mostró un buen desempeño diagnóstico para la identificación de especies de *Candida* de interés clínico. En primer lugar, se destaca la variación de la distribución de las cepas tipificadas, donde *C. albicans* es la especie más frecuente y según varios reportes, es la responsable de la mayoría de las infecciones causadas por levaduras.^{2,6,10,11}

La elevada incidencia de las micosis oportunistas y nosocomiales afectan fundamentalmente a los pacientes con algún tipo de inmunosupresión.^{1,4} De forma particular, las especies del género *Candida* están asociadas a estas infecciones, a pesar del amplio espectro de agentes antifúngicos utilizados como terapia preventiva. Este hecho ha contribuido a la emergencia de nuevas especies, lo cual pudiera explicar que en los resultados del trabajo, 60 % de las cepas aisladas de muestras clínicas tipificadas pertenecen a otras especies de *Candida* no-*albicans*.⁵⁻⁷

El procedimiento modificado brinda la posibilidad de realizar una identificación correcta del agente causal de la infección aislado en un período mínimo de 24 h, lo cual puede modificar la conducta terapéutica y, a su vez, pudiera tener implicaciones directas sobre el tratamiento aplicado al paciente, por causa de la resistencia innata y adquirida de

algunas especies de interés médico a los tratamientos antifúngicos de primera y segunda generación. Ejemplo de ello es el caso de *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans*, que con frecuencia pueden presentar resistencia al fluconazol.⁷⁻¹⁰

Es importante resaltar que a pesar de que la identificación de las especies de *Candida* se logró mediante el análisis coincidente de los patrones de asimilación de hidratos de carbono reportados en la bibliografía, cada método o sistema con este fundamento pueden reflejar variaciones en los porcentajes de reacciones positivas de asimilación, aspecto que debe ser valorado por el analista del ensayo.

El método de asimilación de los carbohidratos es una técnica que forma parte de un conjunto de ensayos que se realizan según la metodología micológica convencional, por lo que la cantidad de compuestos a evaluar pueden ser seleccionados en dependencia de la especie que se sospecha. Los resultados reflejados en la tabla 2, permiten apreciar que el empleo del ácido láctico (AcL) es útil para diferenciar, entre especies, a *C. albicans*, *C. krusei* y *C. kefyr*; sin embargo, excepto en el sistema automatizado ID 32C, no está ampliamente generalizado su uso.¹⁵

Por otro lado, se observa que, si desea aplicar una técnica simplificada de auxonograma, el empleo de los disacáridos (celobiosa, lactosa y trehalosa) y los trisacáridos (melecitosa y rafinosa) son determinantes. Este procedimiento posibilitó el reconocimiento de *Candida kefyr*, lo cual reveló que fue la única especie capaz de asimilar la lactosa, además de la rafinosa y el ácido láctico. En las tablas de identificación de los sistemas ID 32C y API 20C AUX, se reportan datos variables de positividad, 83 y 18 %, para el sorbitol y 85 y 34 %, para la xilosa, respectivamente, las cuales resultaron negativas en el estudio, por lo que se considera que no son concluyentes para definir esta especie en cuestión.^{12,15}

La diferenciación entre *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, ambas positivas a la melecitosa, se logró al evaluar la celobiosa, porque la asimilación fue negativa para *C. parapsilosis* y positiva para *C. tropicalis* al aplicar el método modificado. No obstante, la reacción de asimilación de la celobiosa, reportada en la tabla de identificación de los sistemas ID 32C y API 20C AUX, es variable para esta especie, 91 y 17 % en cada sistema.^{12,15}

El alto grado de reproducibilidad evidenciado por el procedimiento modificado de auxonograma, al identificar las diferentes cepas de *Candida*, puede atribuirse a las ventajas que ofrece el método, entre las que se incluyen: el uso de un medio de cultivo sintético de fácil preparación, esterilizable en autoclave, con mayor contenido nutricional, que puede conservarse antes de su uso a temperatura de 2 a 8 °C hasta 2 semanas, su reducido período de incubación y los mínimos requisitos de habilidad para la interpretación de la prueba.

La exactitud para determinar las reacciones de asimilación empleando la modificación del método propuesto permite asegurar que este resultó altamente favorable, conveniente y práctico, porque logró un ahorro sustancial de material y de tiempo, todo lo cual se evidenció al lograr evaluar, de manera simultánea, 14 sustancias que constituyen las fuentes de carbono fundamentales para la diferenciación de las especies de *Candida*. El método propone una alternativa para realizar la prueba en caso de no contar con discos impregnados con sustancias carbonadas. Estos aspectos son relevantes en un laboratorio de recursos limitados, especialmente si se maneja una elevada carga de trabajo y contribuye a minimizar los gastos, sin perder la efectividad de la prueba.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Carlos Fernández Andreu, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; al licenciado Jorge L. Muñoz, Hospital Pediátrico "Leonor Pérez"; doctora María del Carmen Halley, Hospital Clínico-Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" y licenciado Ernesto Hernández, Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez", de Ciudad de La Habana, por proporcionar las cepas aisladas para la realización de este estudio.

Identification of *Candida* species of clinical importance by means of a modified auxonographic method

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Candida* species are responsible for the most common opportunistic mycotic infections. Rapid and accurate identification of yeast has become relevant not only for the effective management of infections, but also for the prevention of drug resistance. Up to now, yeast identification procedures

are based on a variety of tests, including their ability to use sugars. **OBJECTIVE:** the purpose of the study was to evaluate a modified auxonographic procedure with the use of carbonated compounds for the rapid identification of *Candida* species within 24 to 48 h. **METHODS:** the new procedure is based on the carbohydrates assimilation (auxonograph) and was developed and evaluated for the identification of the most clinically relevant *Candida* species. A total number of 164 *Candida* species strains were included in the study, 156 of them were isolated from clinical specimens and other 8 reference strains from the central culture collection of BioCen (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. kefyr*). The new methodology was based on the use of standardized yeast suspension of carbon-free culture medium sterilized by autoclaving. After gelling the mixture (60 mL of cultural medium and 3 mL of microbial suspension), 10 µL of different carbohydrate filtering-sterilized solutions were dispensed at different points of the culture medium surface. The carbohydrate uptake was seen as a growth zone around the carbohydrate point of distribution after 24-48 h of incubation. **RESULTS:** all *Candida* species were correctly identified by the modified auxonographic method and 100 % agreement with the Wickerham technique was achieved. **CONCLUSIONS:** the alternative method for the auxonographic carbon test is simple, reliable, faster and easier to interpret than the Wickerham method.

Key words: carbohydrates, uptake, auxonographic procedure, yeasts identification, *Candida*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133-63.
2. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, Saporiti A. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:189-95.
3. Kenneth JR. *Candida*, *Aspergillus* y otros hongos oportunistas. En: Ryan KJ, Ray G, Sherris C, editors. *Microbiología Médica*. 4ta ed. México: McGraw - Hill Interamericana; 2005. p. 725-31.
4. Dictar MO, Maiolo E, Alexander B, Jacob N, Verón MT. Mycoses in the transplanted patient. *Medical Mycology.* 2000;38(S1):251-8.
5. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sánchez F, Ayats J, et al. Epidemiology risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* blood-stream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1681-5.
6. Al-Tawfiq JA. Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996-2004. *Int J Infect Dis.* 2007;11:239-44.
7. Baran J, Muckatira B, Khatib R. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand. J Infect Dis.* 2001;33:137-9.
8. Borg-Von Zepelin M, Kunz L, Ruchel R, Reichard U, Weig M, Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:424-8.
9. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:767-71.

10. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:679-82.
11. Guelfand L, Grisolia P, Bozzano C, Kaufman S. Comparison of methods for the identification of the most common yeasts in the clinical microbiology laboratory. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35:49-53.
12. Geraldo dos Santos O, Teixeira Ribeiro E, de Assis Baroni F. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2006;48(6):311-5.
13. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 4th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 2002. p.115.
14. De Hoog GS, Guarro J, Tan CS, Winternans RGF, Gené J. Pathogenic fungi and common opportunists. En: De Hoog GS, Guarro J, editors. Atlas of clinical fungi. Baarn and Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures and Universitat Rovira i Virgili; 1995. p.1-238.
15. Cárdenes-Perera CD, Torres-Lanaab A, Alonso-Vargasc R, Moragues-Tosantasc MD, Pontón-San Emeterioc J, Quindós-Andrés G, et al. Evaluation of API ID 32C® and VITEK-2® to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(3):219-21.
16. Land GA, Salkin IF, el-Zaatari M, McGinnis MR, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol.* 1991;29(4):718-22.
17. Graf B, Adam T, Zill E, Gobel UB. Evaluation of the VITEK system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1782-5.
18. Sader HS, Miranda EA. Limitações dos métodos automatizados em Microbiologia; São Paulo: Jornada de Iniciação Científica, 4, Botucatu, PEM-UNIFESP, Anais; 1999. p.14-6.
19. Pérez C, Goitia K, Mata S, Hartung C, Colella MT, Reyes H, et al. Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la Ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2002;2:136-140.
20. Mickelsen PA, McCarthay LR, Propst MA. Further modifications of the auxanographic method for identification of yeasts. *J Clin Microbiol.* 1977;5:297-301.
21. Rippon JW. The Pathogenic Fungi. In: Rippon JW, editor. *Medical Mycology.* Chap 21. 3er ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1988. p. 532-58.
22. Araujo C. Diagnóstico de laboratorio de levaduras. En: Araujo C, editor. *Manual de procedimientos para el diagnóstico etiológico de enfermedades de transmisión sexual.* Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual. Mérida: Facultad de Farmacia Universidad de Los Andes; 1997. p. 12-35.
23. Hartung C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 1989;106:73-9.
24. Rodríguez E, Lirio V, Lacaz CS. Preservacao de fungos e actinomicetos de interesse médico en agua destilada. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1992;34:159-65.
25. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñoz V, Lobaina Rodríguez T, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, et al. *Manual de Medios de Cultivo.* 3ra ed. Habana: BioCen; 2004. p. 265. ISBN 959-7160-25-0
26. Adams ED, Cooper BH. Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeasts. *Am J Med Technol.* 1974;40:377-88.
27. Lacaz C, Porto E, Costa JE. Técnicas micológicas e inmunológicas. Técnicas de coloracao em micopatologia. Meios de cultivo. Manutencao de culturas. Cultivo en lámina. Preparo de antígenos micóticos. Técnicas micológicas e inmunológicas de uso corriente. Cap 36. En: Lacaz C, editor. *Micología Médica.* Sao Paulo: Savier; 1991. p. 557-75.
28. López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:16-21.
29. Godoy P, Almeida LP, Lopes Colombo A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18(4):197-9.
30. Quesada Gómez C, Murillo Hidalgo L, Ureña Varela M, Vargas Monge E. *Candida dubliniensis*: Caracterización, diagnóstico, Importancia en paciente inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans* (Revisión Bibliográfica). *Rev Med Costa Rica Centroam.* 2007;LXIV(578):43-8.

Recibido: 13 de enero de 2009. Aprobado: 30 de agosto de 2009.
 Ing. Tamara Lobaina. Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo. Centro Nacional de Biopreparados. AP 6048, CP 32600. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: (047) 68-2441, Fax: (53 7) 33 8439. Correo electrónico: lobaina@biocen.cu