

## Comunicación corta

### Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal

Andreína Duarte<sup>a</sup>, Arianny Márquez<sup>a</sup>, Celina Araujo<sup>b</sup>, Celina Pérez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Micología; <sup>b</sup>Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual  
Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida - Venezuela

Recibido 24 de noviembre de 2008; aceptado 18 de marzo de 2009

**Resumen:** Las infecciones por levaduras del género *Candida*, en la actualidad son cada vez más frecuentes, particularmente cuando se presentan condiciones que inmunosuprimen al paciente, como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y el uso de quimioterápicos e inmunomoduladores, entre otros. *Candida albicans* es la especie del género que se aísla con mayor frecuencia. Entre las pruebas de identificación para las especies de levaduras del género *Candida* se encuentran la evaluación de las características macroscópicas de las colonias, pruebas fisiológicas, como la prueba del tubo germinal, termotolerancia, auxanograma, zimograma, ureasa y resistencia a la cicloheximida, entre otras. De estas, la prueba del tubo germinal es una prueba sencilla y rápida que puede ejecutarse de varias formas. De manera tradicional se ha realizado en tubo y con suero, aunque también se puede realizar en placa. En este trabajo se revisan las diversas formas de realizar esta prueba y se describe una modalidad adicional, producto de la experiencia diaria en el trabajo de laboratorio, con la ventaja del ahorro de material de vidrio y tiempo.

**Palabras clave:** *Candida albicans*, prueba del tubo germinal, pruebas de identificación

### Modalities of the Germ Tube Test

**Abstract:** At the present time, the infections by yeasts of the genera *Candida*, are more and more frequent, particularly when exists immunosuprimen conditions, like the Acquired Immunodeficiency Syndrome, the use of quimioterapics and immunomodulators, among others. *Candida albicans* is the species most frequently isolated from clinical samples. Among the identification tests of the yeasts species of the genera *Candida* are the evaluation of colony characteristics, physiological and biochemical tests like the germ tube, termotolerancy, auxonogram, zimogram, urease, resistance to cicloheximide, among others. The germ tube test is a simple and fast test, of which several forms exist to carry out it. The traditional way has been made in tube, with serum, although it's possible to be made in plate. Here we present the modality to directly make the test of the germ tube between slide and slide cover, with advantage of time saving and glass material saving.

**Keywords:** *Candida albicans*, germ tube test, identification probes

\* Correspondencia:  
E-mail: celinaperezdesalazar@gmail.com

Dentro de las levaduras del género *Candida* se encuentran más de 150 especies, las cuales son comensales del tracto gastrointestinal, cavidad bucal y la piel. De ellas, solo un pequeño grupo pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, particularmente cuando éste se encuentra en condiciones de inmunosupresión, entre las que se mencionan *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. kruzei*, *C. guilliermondii* y *C. glabrata*, entre otras [1-3].

La especie del género aislada más comúnmente es *Candida albicans*, la cual afecta a la población en un 30 a 40%. En la actualidad son cada vez más frecuentes las infecciones fúngicas intrahospitalarias por esta levadura, generando una elevada morbi-mortalidad en aquellos pa-

cientes con factores de riesgo, como es el caso del uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, el uso de quimioterápicos e inmunomoduladores, enfermedades debilitantes como la diabetes mellitus, y el uso de sondas vesicales. Además, en los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), representan uno de los primeros indicadores de inmunosupresión, ya que experimentan la proliferación de esta levadura de origen endógeno en las superficies mucosas [4-6]. Por otra parte, se estima que 75% de las mujeres padecen al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal durante su vida y 40-50% desarrolla infección vaginal recurrente por *Candida albicans* [7].

La identificación adecuada de la especie de *Candida* aislada a partir de las muestras clínicas es de suma importancia, con el fin de corroborar el diagnóstico clínico, obtener un diagnóstico micológico preciso e instaurar un tratamiento antifúngico adecuado [1-3,6,8].

Entre las pruebas no automatizadas utilizadas para la identificación de las especies de levaduras pertenecientes al género *Candida* se encuentran la observación de las características macroscópicas de la colonia, color de las colonias en el medio CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Microbiology, Francia), análisis de las características fisiológicas, (como la prueba del tubo germinal o la termotolerancia), evaluación de características morfológicas (como la formación de clamidosporas o clamidoconidias), pruebas bioquímicas como el auxanograma (con la asimilación de fuentes carbonadas y nitrogenadas), prueba de la ureasa, resistencia a la cicloheximida, fermentación de azúcares o zimograma, características micromorfológicas (con el uso de microcultivos en agar harina de maíz con Tween 80 al 1%, agar arroz o agar papa-zanahoria), sistemas inmunológicos de aglutinación con partículas de látex para identificación de *C. albicans* (Bichro Látex Albicans®, (Fumouze) y en aislados dudosos, se hace necesario utilizar la genotipificación [1,2,9,10-19].

Una de las pruebas más sencilla, rápida, económica y más utilizada, como prueba preliminar para la identificación del 90-95% de los aislados de *Candida albicans* y *C. dubliniensis*, es la prueba del tubo germinal, conocida también como prueba de filamento en suero o filamento precoz. Dicha prueba se ha realizado tradicionalmente en un tubo que contiene 0,5ml de suero, al cual se le inocula la cepa en estudio y se incuba a 37 °C [1,20,21]. Según Mackenzie, esta temperatura pudiera estar en el rango comprendido entre 31°C y 41°C [20].

Luego de 2-4 horas de incubación a 37 °C, con ayuda de una pipeta Pasteur o de un asa en forma de aro, se toma una porción del contenido del tubo, se coloca en una lámina, se cubre con laminilla y se observa al microscopio con objetivos de 10 y 40X. *Candida albicans* y *C. dubliniensis*, forman una pequeña prolongación filamentosa proveniente de la célula levaduriforme, sin constricción en el punto de origen, semejante a “un espejo de mano”, cuyo espesor puede medir alrededor de la mitad del diámetro de la levadura, y tener una longitud tres a cuatro veces mayor de dicho diámetro. Esta formación constituye el llamado tubo germinal [1,20,21].

El tubo germinal de *C. albicans* puede formarse al inocular las levaduras en suero humano, inclusive si el suero ha sido congelado y almacenado. También, se puede realizar en suero de diversos animales como perro, bovino, conejo, cochino de Guinea y caballo. En cambio, este no se forma en suero caliente coagulado [20].

Sin embargo, esta prueba tiene como desventaja que entre un 5 a 10% de los aislamientos de *C. albicans* no producen tubo germinal; además, existen resultados falsos positivos con las especies de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, debido a la formación de estructuras semejantes a la del tubo germinal, y cuya única diferencia es la presencia de una zona de constricción característica adyacente al

punto de origen del mismo, ubicada en la célula madre. Por otra parte, la proporción de células capaces de formar el tubo germinal disminuye progresivamente al aumentar la concentración celular por encima de 10<sup>7</sup> células por ml, con lo cual se pueden obtener resultados falsos negativos [16,17,22-24].

Existen otras modalidades para realizar la prueba del tubo germinal, menos conocidas, en las cuales se sustituye el suero por diversos compuestos. Entre estas se pueden mencionar:

A) Cultivar la levadura a identificar en la superficie del medio agar agua con 1% de leche. Este medio se prepara hirviendo medio litro de agua destilada y luego se le agregan 10 g de agar. Una vez sembrada la levadura se incuba a 37 °C por 3 horas; posteriormente se procede a tomar una pequeña porción de la colonia y se realiza la observación microscópica entre lámina y laminilla, para la búsqueda de los tubos germinativos [25-26].

B) Uso de plasma de conejo con EDTA (BBL Microbiology Systems). Se reconstituye el plasma con agua destilada estéril (pH 7.2) o en combinación con caldo Soya-Trypticase (TSB, pH 7.0. Scott Laboratories, Inc). La formación de tubos germinales se hace más rápida cuando la combinación del plasma con el TSB es de 3:2; esta preparación se almacena a 4 °C y puede ser utilizada en un período de tiempo de 3,5 semanas. Para la prueba, se parte de una colonia de 24 horas de crecimiento proveniente de agar sangre, se coloca una pequeña porción de la misma en 0,5 ml de la solución anterior y se procede a incubar a 37 °C, por 2-4 horas. Luego de la incubación, se procede a tomar una pequeña porción de la preparación y se coloca entre lámina y laminilla para su observación microscópica [24].

C) Fleming WH y colaboradores en 1977 [27], describen un medio de utilidad para realizar la prueba del tubo germinal, en conjunto con la detección de clamidoconidias. Dichos autores utilizaron el medio de cultivo sólido Oxgall-Tween-ácido caféico (TOC) [Oxgall 10 g, agar 20 g, Tween 80 (solución al 10%) 10 ml, ácido caféico 0,3 g, agua destilada 1.000 ml]. Para su realización, se siembra en agar Sabouraud dextrosa la levadura y a las 72 horas se resiembró una pequeña porción de la colonia en la superficie del agar TOC; posteriormente se coloca con suavidad un cubreobjetos estéril sobre la superficie de la zona sembrada y se incuba a 37 °C en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> por un lapso de 3 horas, manteniendo la tapa de la placa ligeramente abierta para que todo el cultivo sea alcanzado por el CO<sub>2</sub>. Al finalizar el período de incubación, se levanta la laminilla o cubreobjetos y se coloca sobre una lámina con la finalidad de observar al microscopio los tubos germinales que se formaron en dicha zona. La placa con el medio TOC se mantiene a temperatura ambiente con observaciones periódicas por 72 horas para la observación de clamidosporas [27].

D) Otra modalidad es la prueba del tubo germinal entre lámina y laminilla. Ha sido utilizada por la Lic. Celina Araujo, durante sus 35 años de experiencia laboral, tanto en la Universidad de Oriente (en el Laboratorio de Micro-

biología), como en la Universidad de Los Andes (en el Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis), y actualmente se usa en el Laboratorio de Micología de dicha facultad. La misma consiste en realizar la prueba del tubo germinal con una gota de suero, ya sea humano o animal, o en su defecto, una gota de albúmina de huevo, colocada directamente sobre una lámina portaobjeto estéril. Posteriormente se inocula sobre la gota una pequeña porción de la cepa a identificar y se mezcla con ayuda de una asa bacteriológica. Dicha mezcla es cubierta con una laminilla, la cual ha sido previamente flameada con el fin de esterilizarla, y dejada enfriar. Esta preparación entre lámina y laminilla es llevada a la estufa por un lapso de 2-4 horas a 37°C. Luego de este lapso, es observada al microscopio.

Con la aplicación de esta técnica, se presenta la ventaja del ahorro de material de vidrio (tubos, placas, pipetas Pasteur) y suero. Además, es una técnica práctica y sencilla, en la cual la prueba se prepara en la misma lámina en donde se va a observar. A su vez, con esta modalidad se puede usar una gota de albúmina de huevo (clara de huevo) como alternativa para llevar a cabo la prueba, la cual puede ser almacenada en pequeñas porciones bajo refrigeración hasta su uso.

## Referencias

- Trujillo V, Guilarte C, Pardi G. Pruebas rápidas para la detección de *Candida albicans* en cavidad bucal. Acta Odontol Venez. 2006; 44: 441-2.
- Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontol Venez. 2002; 40: 9-17.
- Rueda R. Micosis superficiales y dermatomicosis. Colombia Médica. 2002; 33: 10-6.
- Minghetti P, Valery F, Siciliano L, López M, López D, Ramirez S y col. Candidemia en niños y factores de riesgo asociados. Hospital de Niños J.M. de Los Ríos, 2002-2006. Caracas-Venezuela. Bol Venez Infectol. 2007; 18: 63.
- Heymann D. El control de las enfermedades transmisibles. 18 ed. Washintong, EUA: informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública; 2005. Reporte No. 613.
- Quindós G, Alonso-V Rocío, Helou S, Arechavala AI, Martín E, Negroni R. Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 23-8.
- Llovera V, Perurena M. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56: 21-5.
- Cherubini B, Sanchez-Mirt A, García L. Candidosis vaginal en mujeres sexualmente activas habitantes de una zona rural del estado Falcón, Venezuela. Rev Soc Ven Microb. 2003; 23: 47-50.
- Alvarado D, Díaz M, Silva V. Identificación y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. aislada de micosis invasora. Influencia del porcentaje de inhibición del crecimiento para la determinación de CIM. Rev Med Chile. 2002; 130: 416-23.
- Castro, C. Martín, E. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. Control de Calidad SEIMC. En: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Mico/Cdublinien.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Mico/Cdublinien.htm). Acceso: Diciembre 2008.
- De la Parte M, Mendoza M, Brito A. Identificación de especies de levaduras del género *Candida* provenientes de pacientes con vulvovaginitis. VITAE Academia Biomédica Digital. Abril-Junio 2006; 27. En: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=7&n=87>. Acceso: Diciembre 2008.
- Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras. Rev Soc Venez Microbiol. 2005; 25: 13-21.
- Mendoza M, González I, Bellorín EJ, Salazar W, Mendoza L, Zambrano EA, Albornoz MC. Aislamiento, identificación y serotipificación de levaduras obtenidas del flujo vaginal en pacientes con clínica de vaginitis. Invest Clin. 1999; 40: 25-36.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1923-9.
- Colella MT, Roselló A, Hartung C, Pérez C, Magaldi S, Mata S. Uso de CHROMagar para la identificación de levaduras del género *Candida*. Antibióticos e Infección. 2005; 13: 91-5.
- Godoy P, Almeida LP, López A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 197-9.
- Mc Ginnis D. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York, London: Academic Press; 1980. p 523.
- Ajello L, Georg LK, Kaplan W, Kaufman L. Laboratory Manual for Medical Mycology. Atlanta: Center of Disease Control. 1963.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: American Society of Microbiology; 1999. p 564-6.
- Mackenzie, DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. J Clin Pathol. 1962; 15: 563-5.
- Shepherd, MG. Fungi and parasites in the oral cavity. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. 1 ed. St. Louis - U.S.A: Mosby -Year Book, Inc; 1992. p 373-6.
- Panizo M, Reviákina V, Bellorín E. Dificultades en la identificación de levaduras aisladas de pacientes oncológicos. Rev Soc Ven Microb. 2000; 20: 104-7.
- Rippon J. Tratado de Micología Médica. 3ª ed. México, DF: Interamericana McGraw-Hill; 1990. p 578-621.
- Berardinelli S, Opheim DJ. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1985; 22: 861-2.
- García H, García S, Copolillo E. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. Rev Argent Microb. 2006; 38: 9-12.
- Higuera A, Fontalvo J, Nino L. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo de harina de semillas de frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., frijol chino *Vigna radiata* L. y quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Ciencia. 2003; 11: 14-21.
- Fleming WH, Hopkins JM, Lord GA. New culture medium for presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1977; 5: 236-43.