
COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS POR TÉCNICAS MANUAIS COM O MÉTODO AUTOMATIZADO MICROSCAN RAPID YEAST IDENTIFICATION PANEL

Lúcia Kioko Hasimoto e Souza,¹ Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes,¹
Xisto Sena Passos,¹ Milce Costa,¹ Ary Henrique de Souza Jr.² e Maria do
Rosário Rodrigues Silva¹

RESUMO

A identificação rápida e segura dos fungos é de extrema importância em infecções causadas por leveduras. A identificação de 30 leveduras, sendo 20 pertencentes ao gênero *Candida* e 10 ao gênero *Cryptococcus*, foi realizada por métodos convencionais e pelo MicroScan Rapid Yeast Identification Panel (RYI). Por meio das técnicas convencionais a identificação foi obtida após 20 dias, enquanto no método de MicroScan os resultados foram obtidos em 4 horas de incubação da cultura. Verificou-se que havia concordância de 100% e 95,2% para *C. neoformans* e espécies de *Candida*, respectivamente, quando se compararam os dois métodos. Resultados diferentes foram observados com apenas uma levedura, identificada como *C. guilliermondii* pelos métodos convencionais e *Torulopsis candida* pelo RYI. Os resultados mostraram que este método automatizado é uma excelente alternativa para a identificação das leveduras clinicamente importantes.

UNITERMOS: Leveduras. Identificação. MicroScan. Métodos convencionais.

INTRODUÇÃO

Leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* são as principais leveduras patogênicas para o homem (12). O aumento do número de infecções fúngicas e a maior resistência adquiridos por estas leveduras, principalmente a derivados azólicos (3, 15), justificam a necessidade de uma identificação rápida e correta destes microrganismos.

1 Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG.

2 Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

Endereço para correspondência: Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo
esq. com 1^a Avenida., Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO

Recebido para publicação em 11/4/2001. Revisto em 17/5/2001. Aceito em 23/5/2001.

A candidíase é uma infecção oportunista, localizada principalmente na mucosa bucal e causada por *C. albicans* e por outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (2, 4, 14, 17) e *C. dubliniensis* (1, 12), enquanto a criptococose, comumente localizada no sistema nervoso central, tem como agente causal um fungo do gênero *Cryptococcus*, sendo mais frequentes as variedades de *C. neoformans* (10, 12).

Tanto espécies de *Candida* como leveduras do gênero *Cryptococcus* são identificadas pelas metodologias convencionais (manuais), sendo necessária, para a identificação das variedades de *Cryptococcus neoformans*, a observação do crescimento em meio de canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). Os resultados apresentados por estas técnicas são seguros, apesar de um tempo longo de leitura, aproximadamente de 20 dias (9,10). Para a identificação de leveduras podem-se utilizar sistemas automatizados, como Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo.) e MicroScan Rapid Yeast Identification Panel (Dade, West Sacramento, Califórnia) (7,8,10,14,16). MicroScan Rapid Yeast Identification (RYI) é um teste convencional modificado e cromogênico que permite a identificação de 58 espécies diferentes de leveduras isoladas de material clínico, em um período de quatro horas.

Baseado no exposto acima, o nosso trabalho teve como objetivo buscar um método rápido, eficaz e seguro para a identificação de isolados de leveduras. Métodos convencionais foram comparados com o sistema automatizado MicroScan Rapid Yeast Identification Panel na identificação de 30 leveduras isoladas no Laboratório de Micologia do IPTSP da UFG.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte isolados de leveduras do gênero *Candida* e dez do gênero *Cryptococcus*, cultivados em ágar Sabouraud dextrose, provenientes de diferentes materiais clínicos, foram submetidos à identificação por métodos convencionais e através do método automatizado MicroScan Rapid Yeast Identification Panel. Como controle foram utilizadas as amostras *C. albicans* ATCC10231 e *C. neoformans* CBS 132.

Métodos convencionais de identificação, segundo Kurtzman & Fell (12)

Para a identificação das espécies de *Candida* foram utilizados diferentes testes, entre eles a produção do tubo germinativo, utilizando-se soro fetal bovino, incubado a 37°C, por até três horas; microcultivo de leveduras em ágar farinha de milho com *tween* 80, incubadas à temperatura de 25°C pelo período mínimo de três dias; e provas bioquímicas em que se verificaram a assimilação e fermentação de carboidratos, utilizando-se os

seguintes açúcares: maltose, rafinose, celobiose, lactose, galactose, sacarose e glicose, além da assimilação de nitrogênio, através de peptona e nitrato de potássio (KNO₃).

Para a identificação de *Cryptococcus* sp utilizou-se a prova da tinta da China, por meio da qual se verificou a produção de cápsulas; realizou-se o cultivo em ágar uréia de Christensen, sendo que a leitura, verificada pela mudança do indicador de pH, foi feita após a incubação a 30°C por até cinco dias. Foram ainda realizadas as provas de assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio, conforme descrito para as espécies de *Candida*.

Para a diferenciação das variedades de *C. neoformans* foi feito o cultivo em meio de canavanina glicina azul de bromotimol, sendo a incubação dos isolados a 30°C, por até cinco dias, e a leitura realizada pela alteração da cor, devido à mudança de pH (11).

Sistema automatizado MicroScan Rapid Yeast Identification Panel (RYI)

O RYI contém 29 diferentes substratos aos quais foram inoculados 50 µL da suspensão da levedura em estudo, com turvação correspondente ao padrão que acompanha os painéis. As placas foram incubadas por quatro horas a 37°C.

A leitura dos resultados foi feita de acordo com a mudança de coloração em decorrência do comportamento da levedura perante as diversas reações enzimáticas e de fermentação. O sistema indicou uma lista de microrganismos e sua relativa probabilidade de identificação baseando-se em um número de biotipo formado por nove dígitos.

Toda a metodologia utilizada neste sistema, com relação à técnica e interpretação dos resultados, foi sistematicamente seguida conforme as recomendações do fabricante (Dade).

RESULTADOS

As características microscópicas das 20 culturas observadas pela produção de tubo germinativo em soro fetal bovino e pela morfologia, quando cultivadas em meio de ágar Cornmeal, permitiram identificar a espécie de *Candida*, que foi confirmada pelas suas características de assimilação e de fermentação exibidas por cada espécie. As espécies baseadas na morfologia microscópica estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características microscópicas das espécies com relação à produção de tubo germinativo e morfologia em ágar fubá em 20 isolados de *Candida*

Espécie (n ^o de isolados)	Tubo germinativo	Morfologia em ágar fubá tween 80
<i>C. albicans</i> (15)	+	Clamidoconídios terminais, pseudo-hifas e blastoconídios agrupados na constricção das pseudo-hifas
<i>C. krusei</i> (2)	-	Pseudo-hifas, blastoconídios alongados agrupados nas constricções
<i>C. glabrata</i> (1)	-	Células pequenas redondas a ovais
<i>C. guilliermondii</i> (1)	-	Pseudo-hifas pequenas, ramificadas, com blastoconídios alongados na constricção
<i>C. tropicalis</i> (1)	-	Pseudo-hifas longas, ramificadas, com blastoconídios agrupados na constricção

Uma análise microscópica das dez culturas identificadas macroscopicamente como pertencentes ao gênero *Cryptococcus* mostrou a presença de cápsula mucopolissacarídica em tinta da China em todos os isolados estudados. As provas de utilização da uréia, a assimilação de hidratos de carbono e de nitrogênio e a fermentação de hidratos de carbono apresentaram-se com comportamento padrão para *C. neoformans*. A análise das variedades de *C. neoformans* por meio de canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) mostrou a mudança de coloração em dois isolados de *C. neoformans* para azul-cobalto, permitindo a sua identificação em *C. neoformans* var. *gattii*.

A identificação de *C. albicans* pelo Rapid Yeast Identification Panel mostrou que todos os isolados desta espécie de levedura apresentaram resultados positivos para os seguintes substratos: β naftilamina, hidroxiprolina (HPR), glicil-L-arginina 4 metoxi (GLAR) e L-prolina (PRO), p-nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosaminida (NGAL) e para p-nitrofenil- α -D-glicopiranosida (AGL2). Para *C. neoformans* observou-se reação positiva para uréia (URE), glicil-L-prolina-4 metoxi- β -naftilamina (GLPR) e p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina (NAG).

Os resultados obtidos na identificação das leveduras pelo método convencional comparados com o Rapid Yeast Identification Panel mostraram boa concordância, sendo que para as espécies de *Candida* e de *C. neoformans* verificou-se uma concordância de 95,2% e 100%, respectivamente. Somente um isolado teve resultado diferente, sendo identificado como *C. guilliermondii* pelo método convencional e como *T. candida* pelo RYI. A comparação da identificação das leveduras obtidas através dos métodos convencionais e através do Rapid Yeast Identification Panel encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação de isolados de leveduras de diferentes materiais clínicos e das cepas padrão através de métodos convencionais e Rapid Yeast Identification Panel

Espécies	Métodos convencionais	RYI panel
<i>C. albicans</i>	15	15
<i>C. krusei</i>	02	02
<i>C. glabrata</i>	01	01
<i>C. guilliermondii</i>	01	-
<i>C. tropicalis</i>	01	01
<i>Toluropsis candida</i>	-	01
<i>C. neoformans</i>	10	10
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	08	--
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	02	--
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	01	01
<i>C. neoformans</i> CBS 132	01	01

A probabilidade relativa de identificação mostrou-se com elevado percentual com relação à espécie *C. albicans* e *C. neoformans*; no entanto um percentual menor que 76% foi verificado para *C. krusei* e *C. glabrata*. As probabilidades de identificação, segundo a leitura no MicroScan, observadas para todas as espécies isoladas são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação das leveduras isoladas de diferentes materiais clínicos e leveduras padrão pelo RYI com leitura no autoSCAN-4

Espécies	Nº isolados	Probabilidade de identificação (%)
<i>C. albicans</i>	15	82,96 - 99,62
<i>C. krusei</i>	02	63,28 - 76,48
<i>C. glabrata</i>	01	69,41
<i>T. candida</i>	01	99,05
<i>C. tropicalis</i>	01	96,48
<i>C. neoformans</i>	10	99,60 - 99,99
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	01	99,62
<i>C. neoformans</i> CBS 132	01	99,99

DISCUSSÃO

O elevado índice de concordância (96,8%) entre a identificação das leveduras obtidas pelo MicroScan, comparado aos métodos tradicionais, foi de grande relevância, principalmente quando se considera que estes resultados foram obtidos em um único teste, em apenas quatro horas, período de tempo curto, quando confrontado com os métodos convencionais. Uma

técnica de identificação de leveduras, o API 20C, é considerada uma metodologia de referência, e trabalhos têm demonstrado que os resultados são equivalentes aos observados pelo MicroScan (5,13,16).

A equivalência de resultados com relação à identificação de *C. albicans* e *C. neoformans* encontrados no nosso estudo, pelas duas metodologias, mostrou que o MicroScan pode ser usado na identificação destas leveduras. Para algumas leveduras, como *C. krusei* e *T. glabrata*, a baixa probabilidade de identificação observada encontra consonância nos resultados obtidos por diferentes pesquisadores, os quais verificaram níveis reduzidos de correlação de identificação entre leveduras do gênero *Candida* não pertencentes à espécie *albicans* quando se utiliza o método MicroScan e API 20C (13,14).

Em um total de 32 identificações realizadas pelos dois métodos, observou-se apenas um resultado diferente, com MicroScan identificando *T. candida* e as provas convencionais, *C. guilliermondii*. Land *et al.*(1991) observaram que de sete isolados de *C. guilliermondii* obtidos nas provas convencionais, apenas três foram identificadas pelo MicroScan em teste inicial.

A simplicidade técnica e operacional, aliada a um perfil de 27 provas, que aumentam substancialmente a confiabilidade, a concordância com os métodos convencionais e, principalmente, a diminuição no tempo de identificação, faz do sistema MicroScan Rapid Yeast Identification Panel uma excelente alternativa para a identificação das leveduras clinicamente importantes.

SUMMARY

A comparison between conventional tests and the automatized method of Rapid Yeast Identification Panel

The safe and fast yeast identification is of furthestmost importance in fungal infections. The identification of 30 yeasts (20 of the *Candida* and 10 of the *Cryptococcus* genus) was carried out by the conventional methods and by the MicroScan Rapid Yeast Identification Panel (RYI). Identification was obtained after 20 days by means of the conventional techniques, while results were obtained in 4 hours with the RYI. The comparison of the 2 methods showed a 100% and 95,2% agreement to *C. neoformans* and *Candida*, respectively. Different results were observed with only one yeast, which was identified as *C. guilliermondii* by the conventional methods and as *Torulopsis candida* by the RYI. Results show that the automated method is an excellent option for the identification of clinically relevant yeasts.

KEYWORDS: Yeasts. Identification. MicroScan. Conventional methods.

REFERÊNCIAS

1. Alves SH, Oliveira LTO, Santurio JM. A importância de *Candida dubliniensis* no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas. *Rev Brasil Anal Clin* 32:65-68, 2000.
2. Aly FZ, Blackwell CC, MacKenzie DAC, Weir DM. Identification of oral yeast species isolated from individuals diabetes mellitus. *Mycoses* 38:107-110, 1995.
3. Bossche, BV. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14:44-49, 1997
4. Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Geremia C, Martino P, Fernández-Rodríguez M, Quindós G, Pontón J. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis* 171:967-975, 1995.
5. Crist Jr AE, Johnson LM, Burke PJ. Evaluation of the microbial identification system for identification of clinical isolated yeast. *J Clin Microbiol* 34:2408-2410, 1996.
6. Elder BL, Roberts GD. Rapid methods for diagnosis of fungal infections. *Lab Med* 17:591-596, 1986.
7. Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of most frequent clinical yeast. *Rev Iberoam Micol* 14:85-89, 1997.
8. Freydière AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three media for direct identification and discrimination of *Candida albicans* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:464-467, 1997.
9. Kregger-Van Rij NJW. *The Yeast: a taxonomic study*. Amsterdam. Elsevier. 1984, 1082p.
10. Kwon-Chung KJ, Bennett, JE. *Medical Mycology*. Lea & Febiger. Philadelphia. 1992. pag 379.
11. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorotypes A and D) and *C. neoformans* var. *gatii* (Sorotypes B and C). *J Clin Microbiol* 115:535-537, 1982.
12. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, 4^a ed. Amsterdam. 1998.
13. 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* 29:718-722, 1991.
14. Riddle DL, Giger O, Miller L, Hall GS, Woods GL. Clinical comparison of the Baxter MicroScan yeast identification panel and the Vitek yeast biochemical card. *Am J Clin Pathol* 101:438-442, 1994.
15. Reiss E, Tanaka H, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais P, Hanazawa R, Latge JP, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 36: 249-257, 1998.
16. St.-Germain G, Beauchesne D. Evaluation of the MicroScan rapid yeast identification panel. *Clin Microbiol* 29: 2296-2299, 1991.
17. Trick WE, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infection in the 1990. *Rev Iberoam Micol* 15: 2-6, 1998.