
IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO
***Candida* POR MÉTODOS MANUAIS CONVENCIONAIS**
E PELO MÉTODO
CROMÓGENO CHROMAGAR™ CANDIDA.

*Crystiane Rodrigues de Araujo, Karla Carvalho Miranda, Xisto Sena Passos, Lúcia Kioko Hasimoto Souza, Janine de Aquino Lemos, Claudine Hassan Abbas Khrais, Carolina Rodrigues Costa, Maria do Rosário Rodrigues Silva e Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes*¹

RESUMO

Diferentes meios cromógenos de cultivo, fundamentados na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos, têm sido utilizados para diferenciar *Candida albicans* e outras leveduras de interesse clínico. O meio de cultura CHROMagar Candida é usado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Neste trabalho, o meio cromógeno CHROMagar™ Candida foi usado para a identificação de 53 leveduras previamente identificadas por métodos manuais convencionais como *Candida albicans* (34), *C. tropicalis* (7), *C. krusei* (5) *C. glabrata* (4) e *C. parapsilosis* (3). Das 34 amostras identificadas por métodos convencionais como *C. albicans*, 30 (88,2%) apresentaram a coloração verde-escura brilhante própria desta espécie no meio cromogênico. As características relativas à coloração e à morfologia, mostradas em CHROMagar Candida, apresentaram-se compatíveis com *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em todas as amostras estudadas, enquanto 5 dos 7 isolados (71,4%) de *C. tropicalis* apresentaram a coloração azul característica desta espécie. Com os resultados obtidos concluiu-se que o meio CHROMagar Candida pode ser útil na identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida*.

DESCRITORES: *Candida* spp. Identificação. CHROMagar™ Candida.

INTRODUÇÃO

Embora *Candida albicans* seja predominante em amostras clínicas, outras espécies de *Candida* têm sido relatadas como importantes patógenos

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

Endereço para correspondência: Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes, Rua 6, n. 664/702, Setor Oeste, Goiânia-GO, CEP: 74115-070. E-mail: orion@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 30/3/2005. Revisto em 16/6/2005. Aceito em 20/6/2005.

oportunistas (1, 5). Algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* têm-se mostrado intrinsecamente resistentes ao fluconazol, enquanto *C. lusitaniae* tem sido relatada como resistente à anfotericina B (3, 7, 14). Conseqüentemente, faz-se necessária uma identificação rápida e precisa dessas leveduras para que se estabeleça uma terapia antifúngica adequada (8).

As técnicas convencionais para identificação das espécies de *Candida* são baseadas principalmente em métodos bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, habilidade em formar tubos germinativos a 37°C em soro e produzir clamidoconídios em ágar Corn-meal (Difco) acrescido de tween 80 (9).

Nos últimos anos, diferentes meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar *Candida albicans* e outras leveduras de interesse clínico têm sido comercializados. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos (3,4,7,12). O meio de cultura CHROMagar tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (1, 10, 15, 16). Este meio se baseia na utilização do substrato β glicosaminidase (4, 13) e diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias (3, 6). A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras e, também, fornece resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados.

Neste trabalho, foi avaliado a utilização do meio de CHROMagar™ *Candida* para identificação presuntiva das espécies de *Candida* provenientes de amostras de urina de pacientes da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras, isolamento e identificação

As 120 amostras de urina obtidas de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco), incubadas em temperatura ambiente por até 72 horas para obtenção de crescimento de leveduras.

A identificação das leveduras foi realizada pelos métodos convencionais como morfologia da colônia, prova do tubo germinativo, produção de clamidoconídios e prova de assimilação de hidratos de carbono, segundo Kurtzman & Fell (9). *C. albicans* ATCC 64548 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle da metodologia.

Todos os isolados foram estocados em ágar Sabouraud dextrose a 4°C e subcultivados por um período de 24 a 48 horas antes da inoculação em meio cromogênico, CHROMagar™ *Candida*.

Identificação através de CHROMagar™ Candida

O CHROMagar™ Candida (Microbiology, France) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas foram estocadas a 4°C no escuro. Cada isolado foi subcultivado neste meio e incubado a 30°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias (7).

RESULTADOS

Foram isoladas 53 leveduras de 120 amostras de urina de pacientes da UTI do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Essas leveduras foram identificadas pelos métodos convencionais como *Candida albicans* 34 (64,2%), *C. tropicalis* 07 (13,2%), *C. krusei* 05 (9,4%), *C. glabrata* 04 (7,5%) e *C. parapsilosis* 03 (5,7%) (Figura 1).

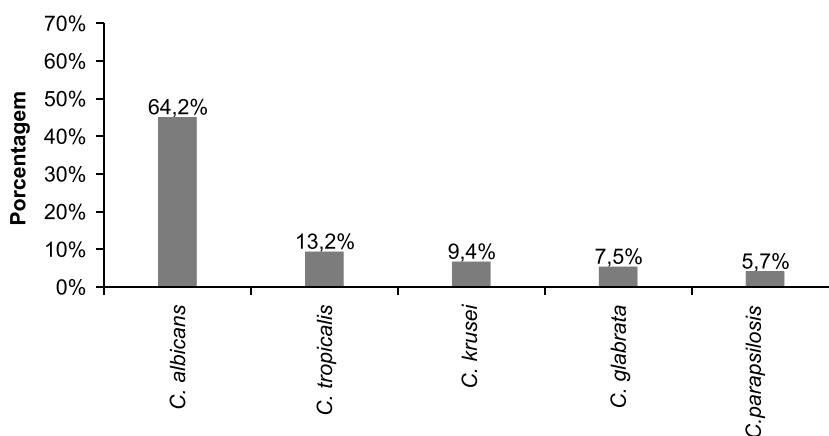


Figura 1. Espécies de *Candida* identificadas pelos métodos convencionais em 53 leveduras isoladas de urina.

Dentre os 34 isolados de *C. albicans* que foram cultivados em meio CHROMagar Candida, 88,2% (30) mostraram características morfológicas e pigmentação das colônias compatíveis com esta espécie, enquanto quatro deles apresentaram-se indefinidos. As espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* (3), *C. krusei* (5) e *C. glabrata* (4) mostraram 100% de concordância entre os dois métodos. Dos sete isolados identificados pelos métodos convencionais como *C. tropicalis*, 71,4% (5) apresentam-se com colônia característica de cor azul e rugosidade na parte externa em CHROMagar™ Candida (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de concordância entre os métodos convencionais e CHROMagar de 53 leveduras do gênero *Candida*.

Métodos convencionais	CHROMagar™ <i>Candida</i>	Morfologia e pigmentação das colônias em CHROMagar™ <i>Candida</i>	Concordância (%)
<i>C. albicans</i> (34)	<i>C. albicans</i> (30)	Verde	88,2
<i>C. tropicalis</i> (07)	<i>C. tropicalis</i> (05)	Azul	71,4
<i>C. krusei</i> (05)	<i>C. krusei</i> (05)	Rosa, rugosa	100
<i>C. glabrata</i> (04)	<i>C. glabrata</i> (04)	Lilás	100
<i>C. parapsilosis</i> (03)	<i>C. parapsilosis</i> (03)	Rosa, lisa	100

DISCUSSÃO

CHROMagar™ *Candida* é um meio cromógeno que permite a identificação presuntiva das leveduras por conter vários substratos enzimáticos que, hidrolizados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia em um tempo de 24 a 48 horas (13). O meio utilizado indica colônias verde-claras para *C. albicans*, verde-escuras para *C. dubliniensis* e azuis para *C. tropicalis* (11, 16).

Os resultados obtidos mostraram que 30 dos 34 isolados de *C. albicans*, identificados por métodos bioquímicos, produção de tubo germinativo e de clamidoconídios, apresentaram colônias verde-claras, enquanto 5 das 7 amostras identificadas por métodos manuais como *C. tropicalis* exibiram colônias de cor azul em CHROMagar™ *Candida*. Estes resultados mostraram, portanto, uma concordância entre as metodologias de 88,2 % para *C. albicans* e de 71,4% para *C. tropicalis*. Yucesoy & Marol (17) verificaram uma pequena variação nos resultados com relação a estas espécies, visto que 168 de 169 isolados de *C. albicans* se apresentaram com colônias verde-claras em CHROMagar™ *Candida*; de 33 *C. tropicalis* estudadas, 32 isolados se mostraram de cor azul e um se apresentou de cor rosa-escuro. Com relação a *C. tropicalis*, nossos resultados mostraram-se semelhantes aos de Cooke et al. (4) que verificaram sensibilidade de detecção de 72,7% em dez amostras estudadas. Embora *C. dubliniensis* tenha surgido, desde 1995, como patógeno emergente, principalmente na mucosa bucal de pacientes com AIDS, e o meio de CHROMagar seja considerado um bom método fenotípico de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, não conseguimos identificar esta espécie (15).

A coloração rósea verificada em nosso estudo, nos cinco isolados de *C. krusei*, tem sido encontrada por diferentes pesquisadores (4,11). As colorações rosa e lilás, no entanto, são comuns em diferentes espécies de *Candida* (*C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), o que dificulta a interpretação do teste. Por isso foi necessário recorrer a outras características tais como rugosidade e extensão das

bordas das colônias para orientar a identificação dessas espécies. Esta peculiaridade de rugosidade ao redor das colônias, por exemplo em *C. krusei*, foi citada por Garcia-Martos et al. (7). A identificação de *C. krusei* é de grande importância, já que esta é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol (2). A identificação presumtiva de leveduras do gênero *Candida* em um tempo de 24 horas pode ser obtida quando se semeia a amostra clínica em meio de CHROMagar. Este meio também se mostra útil na detecção de leveduras em material clínico que contenha cultura mista de *Candida*, cuja característica de crescimento em ágar Sabouraud dextrose não permite esta diferenciação (6). Neste trabalho, observamos que uma das amostras cultivadas no meio de ágar Sabouraud apresentou duas colônias de colorações distintas em meio de CHROMagar, identificadas como *C. albicans* e *C. krusei*, o que foi confirmado posteriormente pelos métodos convencionais.

A similaridade de 100% verificada na identificação de *C. glabrata* e de *C. parapsilosis*, obtida através de CHROMagar™ *Candida*, difere da maioria dos pesquisadores que obtiveram valores em torno de 90%(3,12).

A utilização deste meio mostrou, em nosso estudo, sua capacidade de contribuir para um diagnóstico rápido das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, favorecendo a aplicação de uma terapia antifúngica precoce e adequada.

ABSTRACT

Identification of *Candida* species by conventional methods and by chromogenic medium CHROMagar™ *Candida*.

Different chromogenic media based in the color developed by the colonies due to changes of pH indicator and fermentation of specific organic substances or chromogenic substrate have been used to identify *Candida albicans* and other clinically important yeasts. The CHROMagar™ *Candida* medium is used to isolate and to identify presumptively *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. In this study the chromogenic medium, CHROMagar™ *Candida*, was used for identification of 53 yeasts, previously identified by conventional methods. These methods identified 34 *C. albicans*, 07 *C. tropicalis*, 05 *C. krusei*, 04 *C. glabrata* and 03 *C. parapsilosis*. Of the 34 samples identified by conventional methods as *C. albicans*, 30 (88,2%) showed colonies of dark-green-bright color, characteristic of this species in the chromogenic medium. The coloration and morphologic characteristics in CHROMagar™ *Candida* showed similarity to *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* in all samples analyzed, while only 5 isolates of *C. tropicalis* showed blue colonies characteristic of this species. The results obtained suggest that medium CHROMagar™ *Candida* can be useful in the presumptive identification of *Candida* spp.

KEYWORDS: *Candida* spp. Identification. CHROMagar *Candida*.

REFERÊNCIAS

1. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol* 34: 454-456, 1996.
2. Bouchara JP, Declerck P, Cimon B, Planchenault C, De Gentile L, Chabasse D. Routine use of CHROMagar Candida medium for presumptive identification of Candida yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clin Microbiol Infect* 2: 202-208, 1996.
3. Carrillo-Munõz AJ, Quindós G, Cárdenes CD, Vargas RA, Arévalo P, Brió S, Madariaga L. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de Candida albicans. *Rev Iberoam Micol* 18: 501-108, 2001.
4. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of Candida spp. *Appl Envir Microbiol* 68: 3622-3627, 2002.
5. Foongladda S, Hauharn P, Sakulmaiwatana P, Chaiprasert A. Comparative evaluation of Candi Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. *Mycoses* 45: 75-78, 2002.
6. Fotedar R, Al-Hedaithy SSA. Identification of chlamyospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar Candida medium. *Mycoses* 46: 96-103, 2002.
7. García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina JM, Marín P, Tarello E, Mira J. Identification de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida. *Rev Iberoam Micol* 15: 131-135, 1998.
8. Godoy P, Almeida LP, Colombo AL. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. *Rev Iberoam Micol* 18: 197-199, 2001.
9. Kurtzman, CP. & Fell, JW. *The yeast: a taxonomic study*. 4 ed. New York, Elsevier 1998.
10. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 36: 1157-1159, 1998.
11. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 32: 1923-1929, 1995.
12. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 34: 58-61, 1996.
13. Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Mazuelos EM, Negroni R. Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. *Rev Iberoam Micol* 18: 23-28, 2001.
14. Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, Bernard EM, Armstrong D, Perlin DS. Prospective study of Candida species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrob Agents and Chemother* 45: 2129-2133, 2001.
15. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennet DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507-1521, 1995.
16. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristic and identification. *J Clinical Microbiol* 36: 329-334, 1998.
17. Yucesoy M, Marol S. Performance of CHROMagar Candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2: 1-8, 2003.