

USO DEL MEDIO CHROMAGAR *Candida* PARA IDENTIFICAR LEVADURAS EN MUESTRAS CLINICAS

(The use of CHROMagar *Candida* medium for the identification of clinical samples of yeast)

Calvo, Belinda¹; López, Marisela²; Luengo, Hayde²; Pineda, Maritza²; Mesa, Luz Mila³.

Cátedra de Medicina Tropical, Escuela de Medicina, Universidad del Zulia¹.

Centro de Referencia de Bacteriología, Hospital Universitario de Maracaibo².

Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Universidad del Zulia³, Maracaibo - Venezuela.

Palabras clave: CHROMagar, levaduras, identificación.

Key Word: CHROMagar, yeasts, identification.

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el uso del medio CHROMagar *Candida* en la rutina de identificación de levaduras, se estudiaron 237 cepas obtenidas de sangre, orina, secreción vaginal y otras muestras clínicas en el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia (Venezuela), provenientes de 116 pacientes ambulatorios u hospitalizados, durante el período Marzo a Diciembre de 1999. Para la preparación del medio de cultivo y la lectura del color de las colonias, se siguió la recomendación del fabricante (CHROMagar *Candida*, Paris, France). De manera simultánea se realizaron pruebas de filamentización, fermentación de carbohidratos y asimilación de fuentes carbonadas y nitrogenadas; en algunos casos se utilizó el sistema API 20C.

Los resultados mostraron una especificidad del 100% del medio CHROMagar *Candida* para la identificación de *Candida albicans* (colonia verde), *Candida tropicalis* (colonia azul) y *Candida krusei* (colonia rosada). En tres muestras se pudo separar mas de una especie, esta diferenciación se hizo fácilmente visible por los diferentes colores de las colonias.

Este estudio corrobora la utilidad de este medio para la identificación rápida de las principales especies del género aisladas de material clínico.

INTRODUCCION

Las manifestaciones clínicas a nivel de mucosas o tejidos profundos por candidosis, pueden ser producidas por varias especies del género *Candida*; la identifica-

SUMMARY

In order to evaluate the use of CHROMagar *Candida* culture medium in the identification routine of yeasts, 237 strains isolated from blood, urine, vagina secretion and other clinical samples at the Bacteriological Reference Center of the University Hospital of Maracaibo, Zulia State, Venezuela, obtained from 116 ambulatory or indoor patients, during a period of time from March to December 1999, were studied.

The recommendation of manufacturer house (CHROMagar *Candida*, Paris, France) was followed for the preparation of culture medium and colony color reading. In a simultaneous way, tests like, filamentization, fermentation of carbohydrates and assimilation of carbon and nitrogen sources were carried out; in some cases the API 20C system was used.

The results shown a 100% specificity of CHROMagar *Candida* for the identification of *Candida albicans* (green colony), *Candida tropicalis* (blue colony) and (pink *Candida krusei* colony). In three samples it was possible to separate more than one species, this differentiation was easily visible by the different colors of the colonies. This study corroborates the usefulness of this medium for the rapid identification of the main species of the genus *Candida* isolated from clinical material.

ción de Laboratorio de estas especies es necesaria para establecer el pronóstico y la terapéutica adecuada (Walsh & Pizzo, 1993).

El medio de Sabouraud es el más utilizado para el aislamiento de *Candida*, sin embargo, en este sustrato la

mezcla de colonias en una misma placa de Petri sólo puede ser detectada por un observador experto. La necesidad de establecer diferencias, de fácil observación, ha incentivado el diseño de sustratos para separar las principales especies del género sobre la base del color de las colonias: medio de Nickerson, Sabouraud adicionado de trifenil tetrazolium chloride, agar fosfomolibdato (Nickerson, 1953; O'Brien, 1964; Pagano *et al.*, 1958; Costa & Blanco, 1964). Estos medios diferenciales no lograron la aceptación para su uso en la rutina de aislamiento de levaduras de importancia médica (Odds & Bernaerts, 1994).

Recientemente se ha desarrollado el medio CHROMagar-*Candida* que simultáneamente detecta e identifica (por reacción de color) las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* con alta precisión (Odd & Bernaerts, 1994; Baumgartner *et al.*, 1996; Phaller *et al.*, 1996; Odds & Bernaerts, 1994; Baumgartner *et al.*, 1996; Lemes *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 1999).

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso del medio CHROMagar-*Candida* en la rutina de identificación de levaduras de importancia médica.

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales (Cepas): Doscientos treinta y siete (237) aislamientos de levaduras obtenidos de sangre, orina, secreción vaginal y otras muestras obtenidas en el Centro de referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, a partir de 116 pacientes hospitalizados o ambulatorios de los diversos servicios del mismo, durante el lapso comprendido entre Marzo a Diciembre de 1999.

2. Reactivos: CHROMagar-*Candida*, Paris, France; dextrosa, peptona, agar, Tween 80 melibiosa, ramnosa, melezitosa, celobiosa, galactosa, maltosa, manitol, inositol de DIFCO Laboratories, Detroit, Chicago; U.S.A.; trehalosa, rafinosa, sorbosa, eritritol de Sigma Chemical, St. Louis, U.S.A.; lactosa, sacarosa, arabinosa, xilosa, nitrato de potasio de Fischer Scientific Company, New Jersey, U.S.A.; Sistema de identificación API 20 C AUX de BioMerieux.

3. Método: Cada aislamiento se inoculó en el medio CHROMagar-*Candida*, (C.A.C.) preparado según las indicaciones del fabricante, incubándose a 37°C durante 72 horas, con lectura macroscópica a las 48 y 72 horas y en el medio Sabouraud-Dextrosa agar a 28°C por 48 horas. A partir del medio de Sabouraud, se realizó la prueba de filamentización, según la técnica de Dalmau, en el medio crema de arroz Tween 80, agar (A.T.A.), con observación microscópica máxima de 7 días. La identificación definitiva

de los aislamientos, se hizo mediante las pruebas de fermentación y asimilación de fuentes carbonadas y nitrogenadas (Kurtzman & Fell, 1998). En los casos donde la metodología clásica no permitiera la identificación, se utilizó el sistema API 20C.

RESULTADOS Y DISCUSION

El crecimiento de los aislamientos pertenecientes a los géneros *Candida* y *Trichosporon* en el medio CHROMagar se observó nítidamente a las 48 horas de inoculación, aumentando la intensidad del color en algunos casos a las 72 horas. La especificidad del CHROMagar fue de 100% para *Candida albicans* (colonia verde); *Candida tropicalis* (colonia azul), *Candida krusei* (colonia rosada) y *Trichosporon* sp. (colonia verde turquesa) (Tabla 1), resultados similares han sido reportados por otros autores (Phaller *et al.*, 1996; Freydiere *et al.*, 1997; Ainscough & Kibbler, 1998; Koehler *et al.*, 1999).

Tabla 1: Color de las colonias en CHROMAGAR *candida* de 237 aislados de levaduras de origen clínico.

ESPECIES	TOTAL DE AISLADOS	RANGO DE COLOR
<i>C. albicans</i>	123	Verde
<i>C. tropicalis</i>	50	Azul
<i>C. rugosa</i>	04	Verde azulado
<i>C. krusei</i>	02	Rosado
<i>C. glabrata</i>	33	Rosa pálido
<i>C. parapsilosis</i>	16	Rosa pálido, Beige con o sin bordes púrpura
<i>C. guilliermondii</i>	02	Beige con o sin bordes púrpura
<i>C. famata</i>	02	Rosa pálido
<i>C. humicola</i>	01	Rosa pálido
<i>C. catenulata</i>	01	Beige con o sin bordes púrpura
<i>C. pelliculosa</i>	01	Beige con o sin bordes púrpura
<i>Trichosporon sp</i>	02	Verde turquesa

Todos los aislamientos de *C. glabrata* presentaron en el medio C.A.C. un color rosa pálido, sin embargo, esta coloración también fue observada en *C. parapsilosis* (algunas cepas), *C. famata* y *C. humicola*.

La coloración rosa pálido de *C. glabrata* ha sido reportada en otros estudios. (Beighton *et al.*, 1995; Odds & Bernaerts, 1994; Koehler *et al.*, 1999). Las cepas de *C. parapsilosis* (16) variaron de beige con o sin borde púrpura.

ra (6) a rosa pálido (10); la dualidad del color en esta especie ha sido reportada previamente (Beighton *et al.*, 1995; Odds & Bernaerts, 1994), a diferencia de otros investigadores que han observado un color constante para esta especie (Giusiano & Mangiaterra, 1998). En tres aislados se pudo separar más de una especie: en un caso la mezcla contenía *C. krusei* y *C. tropicalis*, en otro *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y en el otro *Trichosporon cutaneum* y *C. tropicalis*. Esta diferenciación se hizo fácilmente visible por los diferentes colores de las colonias.

La observación de la morfología en el medio A.T.A. mostró que algunos aislamientos de *C. albicans* (38-30.9%) no presentaron clamidoconidios hasta los siete días de observación, no obstante, la identificación se hizo mediante el CHROMagar y las pruebas fisiológicas convencionales. Todos las cepas de *C. tropicalis* desarrollaron en el medio A.T.A. pseudohifas con blastoconidios dispuestos en forma aislada o en verticilo y las 2 cepas de *C. krusei* mostraron pseudohifas con blastoconidios abundantes en cadenas cortas. La morfología microscópica en el medio A.T.A. de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, conjuntamente con el uso del medio CHROMagar, permite una identificación con alta confiabilidad de estas especies, lo cual ha sido señalado por otros autores (Koehler *et al.*, 1999). Aunque en este estudio sólo se evaluaron 2 cepas de *C. krusei*, los resultados son similares a los señalados por otros autores (Koehler *et al.*, 1999 y Baumgartner *et al.*, 1996).

Todos los aislamientos de *C. glabrata*, presentaron en el medio C.A.C. un color rosa pálido, sin embargo, esta coloración también fue observada en *C. parapsilosis* (algunas cepas), *C. famata* y *C. humicola*.

La coloración rosa pálido de *C. glabrata* ha sido reportada en otros estudios (Bighton *et al.*, 1995; Odds &

Bernaerts, 1994; Koehler *et al.*, 1999). Las cepas de *C. parapsilosis* (16), variaron de beige con o sin borde púrpura (6) a rosa pálido (10), la dualidad del color de esta especie ha sido reportada previamente (Bighton *et al.*, 1995; Odds & Bernaerts, 1994), a diferencia de otros investigadores que han observado un color constante para esta especie (Giusiano & Mangiaterra, 1998). La similitud del color de la colonia (rosa pálido) en el medio C.A.C. de *C. glabrata* y algunos especímenes de *C. parapsilosis* y la variabilidad del color de esta especie, podrían sugerir la poca confiabilidad del medio C.A.C. para la identificación presuntiva de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, agentes etiológicos importantes en candidemia, candiduria, candidosis oral y vaginal, por lo cual para los estudios epidemiológicos de candidosis donde pudieran estar involucradas éstas y otras especies diferentes a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, deben utilizarse los medios convencionales o alternativos de identificación, como el sistema API 20C usado en este estudio para 5 aislamientos: 2 de *C. famata* y uno de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*.

Con el uso del medio C.A.C., en 3 aislamientos se pudo separar más de una especie; en un caso, la mezcla contenía *C. krusei* y *C. tropicalis*, en otro *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y en el otro *Trichosporon cutaneum* y *C. tropicalis*. Esta diferenciación se hizo fácilmente visible por los diferentes colores de las colonias.

Los resultados obtenidos, corroboran las bondades del medio C.A.C., por su utilidad para la identificación presuntiva en breve tiempo, de especies del género *Candida* frecuentemente presente en material clínico y para el fácil reconocimiento de cultivos con mezclas de diferentes especies de levaduras.

REFERENCIAS

- Ainscough, S. & Kibbler, C. (1998). An evaluation of the cost-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. *J. Med. Microbiol.* 47:623-628
- Baumgartner, C., Freydiere, A. & Gille Y. (1996). Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida. *plates J. Clin. Microbiol.* 34:454-456
- Beighton, D.; Ludford, R.; Clark, D.; Brailsford, S.; Pankhurst, C.; Tinsley, G.; Fiske, J.; Lewis, D.; Daly, B.; Khalifa, N.; Marren, V.; Lynch, E. (1995). Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3025-3037
- Costa, S. & Branco, L. (1964). Evaluation of a molybdenum cultures medium as selective and differential for yeasts. *J. Pathol. Bacteriol.* 87:428-431
- Frediere, A.; Buchaille, L. & Gille, Y. (1997). Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16:464-467
- Guisano, G.E. & Mangiaterra, M.L. (1998). Rapid differentiation and presumptive identification of yeasts using *Candida* CHROMagar medium. *Rev. Argent. Microb.* 130:100-3
- Kurtzman, C. & Fell, V. (1998). The yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. Elsevier Science B. V. Amsterdam.
- Koehler, A.; Chu Kai-Ch.; Houang, E. & Cheng, A. (1999). Simple, reliable and cost-effective yeast identification scheme for the clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 137: 422-426
- Lemes, R.; Oliveira, E. & Colombo, A. (1998). Avaliação do meio de CHROMagar *Candida* para recuperação e identificação presumtiva de levaduras provenientes de Banco de cultura. II Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro.

Nickerson, W. (1953). Reduction of inorganic substances by yeasts I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. J. Infect. Dis. 93:45-56

O'Brien, V. (1964). Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. Can. Med. Assoc. J. 90:1073-1074

Odds, F. & Bernaerts, R. (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32:1923-1929

Pagano, J.; Levin, J. & Trejo, W. (1958). Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. Antibiot. Ann 1957-1958: 137-143

Pfaller, M.; Houston, A. & Coffmann, S. (1996). Application of CHROMagar-*Candida* for rapid screenig of Clinical Specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J. Clin. Microb. 34:58-61

Walsh, T. & Pizzo, P. (1993). Laboratory Diagnosis of Candidiasis. In Candidiasis: Pathogenesis, diagnosis and treatment. Edited by G.P. Bodey. Raven Press, Ltd. New York.