

Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar Candida

G. E. GIUSIANO*, M. L. MANGIATERRA

Departamento de Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Las Heras 727, 3500 Resistencia, Chaco, Argentina.

*Correspondencia. Fax: 54-722-22793

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar métodos rápidos y de bajo costo para aislamiento e identificación de levaduras de interés clínico, se utilizó el medio cromogénico CHROM-agar Candida (CAC). Se estudió un total de 546 cepas de especies de levaduras. Las cepas fueron identificadas previamente por métodos convencionales. Se comprobó que los colores y texturas de las colonias de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *Trichosporon beigelii* fueron constantes, lo que permitió su diferenciación de otros hongos levaduriformes. Otras especies presentaron pigmentaciones persistentes, como por ejemplo *C. glabrata* (rosa oscuro), *Saccharomyces cerevisiae* (púrpura), *C. parapsilopsis* (rosa pálido), que acompañadas del estudio de la micromorfología posibilitaron su identificación presuntiva. Comprobamos la aptitud de CAC para el cultivo primario de levaduras, ya que por su contenido en cloramfenicol, admitió el aislamiento y la detección de distintas especies de este tipo de hongos a partir de una muestra clínica. Consideramos a este medio de gran utilidad para la diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras, tanto a partir de cepas aisladas como de muestras clínicas, lo que resulta de gran interés especialmente para el caso de pacientes inmunocomprometidos.

Palabras clave: levaduras, medios cromogénicos, diferenciación de levaduras.

SUMMARY

Fast differentiation and presumptive identification of yeast with CHROM-agar Candida culture medium. In order to evaluate faster and cheaper methods for isolation and identification of clinically important yeasts; we used CHROM-agar Candida (CAC), a chromogenic medium, for differentiation and presumptive identification. A total of 546 yeast strains were studied. Strains were previously identified by conventional methods. The colour and texture of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *Trichosporon beigelii* were always constant and particularly distinctive for a reliable identification. *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. parapsilopsis* colonies also showed constant colour. Because of its contents of chloramphenicol, CAC is also suitable for isolation and observation of mixed yeast species from clinical samples. CAC is a useful medium for reliable differentiation and presumptive identification of clinically important yeasts, particularly from immunocompromised patients.

Key words: yeast, chromogenic medium, yeast differentiation.

La identificación de hongos levaduriformes se basa en el estudio de su macro y micromorfología y en los resultados de pruebas bioquímicas y fisiológicas como el auxonograma, zimograma, producción de ureasa, obtención de clamidosporos, formación de tubos germinativos, etc (3,7). Si bien

éstos son métodos convencionales, significan una serie de etapas que insumen varios días de trabajo para la tipificación de una cepa.

Existen medios diferenciales, con sustratos cromogénicos, en los cuales las colonias toman diferentes pigmentaciones, como el medio de Pa-

gano y Levin con trifeniltetrazolio que se reduce a trifenilformazán. En este medio, según su capacidad de reducción, las colonias toman una coloración variable del rojo al rosa pálido (9). Otro medio cromogénico es el agar BIGGY (medio de Nickerson) con sulfito de bismuto, donde el color de las colonias va del beige ó marrón al negro (4-6). También hay medios para identificación específica de *C. albicans* que utilizan azul de anilina o ac. fosfomolíbdico (1,2,11). Sin embargo, el uso de estos medios no se ha implementado en la rutina del laboratorio para la identificación presuntiva de especies levaduriformes, porque sólo permiten diferenciar algunas especies y a veces dan resultados falsos positivos o falsos negativos.

Los sistemas comerciales que se disponen actualmente permiten una rápida identificación para un determinado espectro de levaduras de interés clínico, unos más amplios que otros según las marcas, pero en general resultan de un costo elevado para su utilización masiva en laboratorios de microbiología.

En la búsqueda y evaluación de métodos rápidos para el aislamiento y la identificación de levaduras de interés clínico hemos utilizado el medio CHROM-agar Candida (CAC) que es un medio cromogénico que se comercializa para la diferenciación e identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (8,10).

Se estudiaron 546 cepas de levaduras obtenidas de diferentes muestras clínicas de pacientes del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste o derivadas de diversos Centros de Salud del nordeste argentino. Las mismas fueron inoculadas en agar Sabouraud glucosado 20% con cloramfenicol (250 mg/l) e incubadas a 28 y 37°C durante 48 h. También se ensayaron cepas controles ATCC de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilopsis*. La identificación se realizó según la metodología de Kreger-van Rij, mediante el estudio macromorfológico en agar Sabouraud, micromorfológico y formación de clamidosporos en agar arroz, producción de tubos germinativos en suero humano a 37°C, producción de ureasa, fermentación de azúcares y asimilación de compuestos carbonados y nitrogenados (3).

Paralelamente se repicaron los especímenes en placas conteniendo el medio CHROM-agar Candida (*Microbiology Paris-Francia*), compuesto por agar (15g/l), peptona (10,2g/l), cloramfenicol (0,5g/l), sustrato cromogénico (22g/l). Se incubaron a 28 y 37°C. Se examinaron entre las 24 y las 72 h, observándose el color y las características de las colonias. Según el prospecto comercial se pueden distinguir las colonias según la pigmentación, *C. albicans* toma color verde, *C. tropicalis* color azul y las de *C. krusei* con tono rosa y blanco a rosa. Algunas muestras clínicas de distinto origen fueron cultivadas directamente en este medio, a fin de comprobar su eficacia en el primocultivo.

De acuerdo con la metodología convencional se identificaron 6 géneros y 14 especies. En el medio CHROM-agar se obtuvo buen crecimiento, definición en el color y textura de las colonias, entre las 48 y las 72 h de incubación. No se detectaron diferencias en el desarrollo a 28 y 37°C. Se identificaron presuntivamente 5 géneros y 10 especies. El 100% de las colonias de *C. albicans*, lisas y brillantes, desarrolló color verde (verde esmeralda), que no se presentó en ningún otro caso. *C. tropicalis*, con textura similar a la anterior pero en ocasiones con borde micelial, produjo un color azul intenso en un 89% (49/55) y *C. krusei* pigmento rosado en un 94% (29/31), con su típico aspecto seco y rugoso. *Trichosporon beigelii* también presentó color azul intenso en el 100% de las cepas examinadas, conservando las características macromorfológicas de colonias rugosas. *C. glabrata* produjo un color rosa oscuro, *C. guillermondii* rosa pálido al igual que *C. papsilopsis*, *Saccharomyces cerevisiae* púrpura o rosa púrpura en todos los casos. La textura de las colonias de estas especies no presentó características distintivas en este medio de cultivo. *Geotrichum* y *Rhodotorula* desarrollaron igual que en los medios comunes para cultivo de hongos, el primero como una colonia aterciopelada y blanca y *Rhodotorula*, lisas y brillantes, con su típico color rojo coral (Cuadro 1).

Empleando este medio para el primocultivo, se observó la presencia de colonias con diferentes pigmentos lo que indicó que la muestra contenía una flora levaduriforme mixta.

Cuadro 1. Características de las colonias de las especies levaduriformes en CHROM-agar Candida.

Especie	Color	Aspecto
<i>Candida</i>		
<i>C. albicans</i>	Verde esmeralda	Lisas, brillantes
<i>C. glabrata</i>	Rosa oscuro	Lisas, brillantes
<i>C. guilliermondii</i>	Rosa, rosa pálido	Planas, brillantes, borde liso
<i>C. krusei</i>	Rosa	Secas, opacas, rugosas
<i>C. parapsilopsis</i>	Rosa pálido	Lisas, brillantes
<i>C. tropicalis</i>	Azul	Lisas, con borde micelial
<i>Geotrichum</i>		
<i>G. candidum</i>	Blanca	Aterciopelada
<i>Rhodotorula</i>		
<i>R. glutinis</i>	Rojo coral	Lisas, húmedas, mucosas
<i>Saccharomyces</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	Púrpura, rosa púrpura	Lisas, planas, húmedas
<i>Trichosporon</i>		
<i>T. beigelii</i>	Azul intenso	Secas, rugosas

La necesidad de disponer de métodos rápidos, confiables y de bajo costo para la identificación de levaduras en la rutina del laboratorio de Micología, ha llevado a la búsqueda de medios de cultivo diferenciales y al perfeccionamiento de medios cromogénicos en los cuales las colonias de distintas especies adquieren diferentes pigmentaciones.

CHROM-agar Candida posibilita la diferenciación de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Trichosporon beigelii*, entre las 48-72 h de incubación, en base al color y morfología específica de las colonias. Este medio ofrece también una orientación hacia la identificación de otras especies habituales en el laboratorio, las que presentan pigmentaciones que varían del rosa pálido al púrpura. Estos resultados acompañados del estudio de la micromorfología en agar-arroz, característica para cada una de las especies mencionadas, facilitan la identificación presuntiva de estos hongos levaduriformes.

Por su contenido en cloramfenicol, CHROM-agar Candida permitió la detección e identificación

presuntiva de una o varias especies de levaduras a partir de la muestra clínica, dando una rápida información basada en las diferentes coloraciones que desarrollaron las colonias.

En base a los resultados obtenidos, consideramos a este medio cromogénico de gran utilidad para facilitar el aislamiento, diferenciación e identificación presuntiva rápida, tanto de cepas puras como de cultivos mixtos o de especímenes clínicos. Esto es de mayor trascendencia en muestras de pacientes inmunocomprometidos para los cuales la celeridad del diagnóstico es de fundamental importancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Mario Alonso, Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional del Nordeste, por su colaboración en la elaboración del manuscrito. A la Empresa Medica-Tec S.R.L. por la donación de kits de CHROM-agar Candida para la elaboración del estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Costa S O, de Lourdes Branco C (1964) Evaluation of a molybdenum culture medium selective and differential for yeast. *J. Pathol. Bacteriol.* 87: 428-431.
2. Goldschmidt M C, Fung D Y C, Grant R, Withe J, Brown T (1991) New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1095-1099.
3. Kreger-van Rij NJW (1984) The yeast, a taxonomic study. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. The Netherlands.
4. Mendel E B, Haberman S, Hall D K (1960) Isolation of *Candida* from clinical specimen. Comparative study of Pagano-Levin and Nickerson's culture media. *Obstet. Gynecol.* 16: 180-184.
5. Nickerson W J (1953) Reduction of inorganic substances by yeast. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *J. Infect. Dis.* 93: 43-44.
6. O'Brien J R (1964) Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. *Can. Med. Assoc.* 90: 1073-1074.
7. Odds F V (1991) Sabouraud's agar. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 355-359.
8. Odds F C, Bernaerts R (1994) CHROM agar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1923-1929.
9. Pagano J, Levin D, Trejo W (1958) Diagnostic medium for the differentiation of species of *Candida*. *Antibiot. Annu.* 6: 137-143.
10. Pfaller M A, Rex JH, Rinaldi MG (1996) Application of CHROM agar *Candida* for rapid screening of clinical specimen for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 58-61.
11. Quindós G, Fernández-Rodríguez M, Burgos A, Tellaetxe M, Cisterna R, Pontón J (1992) Colony morphotype on Sabouraud-triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2748-2752.