

# Diferentes intervalos de tempo de leitura do sistema API 20C AUX® na identificação de leveduras de interesse médico

## Different reading time intervals of the API 20C AUX® system for identifying the yeasts of medical interest

RIALA6/1639

Daise Damaris Carnietto de HIPÓLITO\*, Thiago Nunes ROBERTO, Miriam Rando ARAÚJO, Sandra Regina Brasil Stolf PUKINSKAS

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Micologia, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. E-mail: daise.carnietto@hotmail.com

Recebido: 06.11.2014 - Aceito para publicação: 05.02.2015

### RESUMO

Infeções de corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. *Candida albicans* permanece a espécie mais isolada nestas infecções e é de fácil e rápida identificação. Contudo, existem outras espécies, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, que são encontradas com menor frequência e que necessitam de maior período de tempo e de metodologias comerciais automatizadas ou semi-automatizadas para sua identificação. Neste estudo foram analisadas 146 cepas de leveduras quanto à capacidade do Sistema API 20C AUX® (Biomerieux®, França) em identificar corretamente o gênero e a espécie de microrganismos em diferentes períodos de leitura, visando-se a liberação do resultado em menor tempo. *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. colliculosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon mucoides* e *T. asahii* foram as leveduras cujos resultados finais puderam ser liberados nos períodos de tempo de 96, 120 e 144 h. Oitenta por cento das *C. glabrata* e 69 % das *C. tropicalis* também foram identificadas nos períodos além do tempo estabelecido. Com os resultados obtidos é possível antecipar a identificação do gênero e de algumas espécies de leveduras.

**Palavras-chave.** API 20C AUX, *Candida* sp, leveduras.

### ABSTRACT

Bloodstream infections due to *Candida* genus are one of the leading cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. *Candida albicans* remains to be the yeast species which is the most commonly isolated in these infections. This species is easily and rapidly identified. However there are other species such as *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, which are of lower frequency and they take longer to be detected; and commercially available automated or semi-automated methodologies are needed for their identification. Hundred forty-six yeast strains were analyzed for evaluating the capability of the API 20C AUX® system (Biomerieux®, France) for correctly identifying the microorganism genus and specie in different reading periods of time, and to release the final results in less time. *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Candida pelliculosa*, *C. colliculosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon mucoides* and *T. asahii* were the yeasts released in times of 96, 120 and 144 h. Eighty percent of *C. glabrata* and 69 % of *C. tropicalis* were also identified in periods beyond the established time. With the achieved results, it is feasible to anticipate the identification of the gender and of some yeast species.

**Keywords.** API 20C AUX, *Candida* sp, yeasts.

## INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções oportunistas e ou fatais por leveduras tem aumentado, principalmente nos imunocomprometidos<sup>1-3</sup>. O laboratório de microbiologia tem um papel importante no diagnóstico dos agentes destas infecções promovendo resultados rápidos, com vistas à orientação de terapia antifúngica adequada.

Dentre as espécies patogênicas, *Candida albicans* é a mais prevalente, principalmente em casos de candidemia e candidíase mucocutânea<sup>4</sup>. Entretanto, percebe-se o aumento na frequência de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e Complexo *C. parapsilosis*, consideradas atualmente espécies emergentes que muitas vezes são resistentes a antifúngicos<sup>5,6</sup>. A identificação fenotípica de leveduras não *C. albicans*, por métodos clássicos, pode demorar até 20 dias para conhecimento da espécie<sup>7,8</sup>.

Deste modo, a utilização de métodos comerciais automatizados ou semi-automatizados, como o sistema API 20CAUX® (Biomerieux®, França), são uma alternativa para agilizar o diagnóstico laboratorial. Sua leitura é visual e necessita de até 72 horas para conclusão da identificação. Entretanto nos finais de semana e feriados, os serviços de saúde funcionam em sistema de plantão. Sendo assim, o andamento das identificações fica prejudicado uma vez que as leituras são feitas somente nos dias úteis.

Este estudo teve por finalidade avaliar a identificação de espécies de leveduras pelo sistema API 20 C AUX® em intervalos inferiores e superiores aos propostos pelo fabricante: 48, 72, 96, 120 e 144 h.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 138 isolados clínicos de leveduras provenientes de sangue, líquido-céfal-raquidiano (LCR) e urina, da rotina do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de agosto de 2011 a março de 2012, além de 8 cepas ATCC: *C. albicans* ATCC 90028; *C. dubliniensis* MYA646; *C. tropicalis* 750; *C. famata* 62894; *C. guilliermondii* 6260; *C. parapsilosis* 22019; *C. krusei* 6258 e *Trichosporon inkin* 18020.

Todas as cepas foram purificadas em Ágar cromogênico®. Para a realização do teste, as colônias isoladas foram incubadas em meio Sabouraud com cloranfenicol por 24 h, identificadas pela micromorfologia em metodologia Dalmau plate com ágar fubá acrescido de Tween 80 e analisadas bioquimicamente pelo sistema API 20 C AUX® (Biomerieux®, França). Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou a ausência de turbidez nos poços de cada açúcar testado. Após estes procedimentos, quando solicitados pelo fabricante, foi feita a aplicação de testes complementares, como análises morfológicas, e os resultados das identificações de rotina foram liberados. Para este estudo os Kits foram analisados totalizando 96, 120 e 144 h.

O resultado da identificação de leveduras pelo sistema API 20C AUX® foi analisado em cinco tempos diferentes para leveduras do gênero *Candida* spp, *Trichosporon* spp, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

## RESULTADOS

A habilidade de identificar isolados até a categoria espécie, em período de tempo além do recomendado pelo fabricante, diferiu para *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. colliculosa*, *Candida pelliculosa* e *C. parapsilosis* (Tabela 1).

Todas as cepas de *C. guilliermondii* (n = 6), *C. parapsilosis* (n = 60) e *C. krusei* (n = 3) foram identificadas em todos os tempos propostos (48 h até 144 h).

Foram analisadas 9 cepas de três espécies do gênero *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucooides*), sendo que sete foram identificadas pelo sistema API 20C AUX® nos tempos propostos, exceto duas cepas (*T. mucooides* e *T. asahii*) que não foram identificadas em 48 horas.

Foram testadas 5 cepas de *Candida albicans* identificadas dentro de 72 horas, porém a identificação foi perdida nas leituras após esse período. A cepa ATCC de *C. dubliniensis* não foi identificada em nenhum dos tempos de leitura. Estas espécies foram confirmadas por técnica de biologia molecular.

**Tabela 1.** Resultado da identificação das leveduras encontradas com maior frequência, em diferentes intervalos de tempo

Espécies de leveduras	n	Identificação no tempo				
		Preconizado		Proposto		
		48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
<i>C. albicans</i>	5	NR	100 %	0 %	0 %	0 %
<i>C. parapsilosis</i>	60	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. tropicalis</i>	32	81 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. guilliermondii</i>	6	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. glabrata</i>	25	84 %	84 %	80 %	80 %	80 %
<i>C. krusei</i>	3	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Trichosporon spp</i>	9	78 %	100 %	100 %	100 %	100 %

NR: Não realizado

Todas as cepas de *Candida tropicalis* (n = 32) foram identificadas nos períodos de 72 a 120 h, porém nos períodos de 48 e 144 h, apenas 26 e 22 cepas foram identificadas respectivamente.

Das 25 cepas de *Candida glabrata*, 21 foram identificadas no tempo de 48 e 72 h, sendo que houve dúvida na leitura de uma cepa e em outras três houve baixa discriminação. Nos demais tempos propostos, 20 cepas foram identificadas, onde uma cepa apresentou dúvida na leitura e quatro tiveram baixa discriminação.

Leveduras menos usuais como *R. mucilaginosa* (n = 1), *S. cerevisiae* (n = 1), *C. colliculosa* (n = 1), *C. famata* (n=1) e *C. pelliculosa* (n = 1), apresentaram resultados inconclusivos nas 48 h, porém foram identificadas nos demais tempos de leitura.

## DISCUSSÃO

Das trinta e duas cepas de *Candida tropicalis*, seis tiveram assimilação fraca de alguns açúcares na leitura de 48 h, ocasionando dúvida na interpretação da turvação. No tempo de 144 h, 22 foram identificadas corretamente. Para Ruiz e Paula<sup>9</sup>, 3 isolados de *C. tropicalis* foram identificados pelo mesmo sistema como *C. guilliermondii*.

*C. albicans* e *C. tropicalis* não foram identificadas em alguns dos tempos analisados, porém são espécies que podem ser identificadas presuntivamente em 48 h, com a utilização de meios

cromogênicos<sup>10-12</sup>. Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pela levedura produzindo colônias com várias pigmentações, sendo espécies-específicas, permitindo identificar os microrganismos através da cor e características da colônia<sup>13</sup>.

A dificuldade de identificar fenotipicamente *Candida lipolytica/Candida norvegensis* e *C. krusei/Candida inconspicua* nos sistemas clássicos ou comerciais já foi relatada em um trabalho<sup>14</sup>, no qual foram observados problemas com a habilidade do sistema API 20C AUX® em identificar corretamente 23 cepas *C. krusei* sem a necessidade de testes suplementares. Silva e Candido<sup>15</sup> também encontraram dificuldades em identificar isolados de *C. krusei*, utilizando o mesmo sistema.

## CONCLUSÃO

O tempo de leitura ótimo para identificação das leveduras analisadas foi de 72 horas, correspondendo ao tempo recomendado pelo fabricante.

*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. colliculosa*, *R. mucilaginosa*, *S. cerevisiae*, *T. mucoides* e *T. asahii*, puderam ser identificadas nos tempos de 96, 120 e 144 h. Oitenta por cento das cepas de *C. glabrata* e 69 % das *C. tropicalis* também foram identificadas nos mesmos intervalos, demonstrando a viabilidade da aplicação do kit API 20 C AUX® nos tempos propostos.

Com os resultados obtidos é possível a antecipação da identificação do gênero e de algumas espécies de leveduras. A possibilidade de leitura dos testes pelo sistema API 20C AUX® no primeiro dia útil da semana e posterior a feriados, poderá orientar a terapia antifúngica adequada com o conhecimento das leveduras isoladas.

## REFERÊNCIAS

1. Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4434-40. doi: 10.1128/JCM.43.9.4434-4440.2005.
2. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2766-71. doi: 10.1128/JCM.00654-09.
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503-35. doi: 10.1086/596757
4. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*. 2006;43:S3-S14.
5. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23. doi: 10.1128/JCM.00773-06.
6. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 57(4): 399-404. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.011.
7. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica* 8ª Ed. Editora Sarvier, São Paulo; 1991.
8. Lopes J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich AC, Pacot A, et al. A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1172-4. doi: 10.1128/JCM.39.3.1172-1174.2001.
9. Ruiz LS, Paula CR. Fungemia por leveduras: perfis fenotípicos e moleculares e sensibilidade antifúngicas de amostras isoladas no Hospital das clínicas de Botucatu, São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2008.
10. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1923-9.
11. Cooke V, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(7):3622-7. doi: 10.1128/AEM.68.7.3622-3627.2002.
12. Khan ZU, Suhail A, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new method for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4796-8. doi: 10.1128/JCM.42.10.4796-4798.2004.
13. Baixench MT, Taillandier A, Paugam A. Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses*. 2006;49(4):311-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01259.x.
14. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6): 1967-70.
15. Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API20C AUX system for the identification of clinically important yeasts. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3):261-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000300012>.