

Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico

Evaluation of the API20C AUX system for the identification of clinically important yeasts

Jaqueline Otero Silva¹ e Regina Célia Candido²

RESUMO

Cinquenta leveduras, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*, foram identificadas pelas metodologias clássica e sistema API20C AUX. O sistema comercial identificou corretamente 92% das espécies sendo necessários testes adicionais em 16% dos casos. Os resultados foram interpretados como bom, muito bom e de excelente identificação.

Palavras-chaves: API 20C AUX. *Candida sp.* Leveduras. *Trichosporon sp.*

ABSTRACT

Fifty yeasts belonging to the genera *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Trichosporon* were identified by classical methods and by the API 20C AUX system. The commercial system correctly identified 92% of the species, with the need for additional tests in 16% of cases. The results were interpreted with good, very good and excellent identification.

Key-words: API 20C AUX. *Candida sp.* Yeasts. *Trichosporon sp.*

As leveduras do gênero *Candida* podem causar uma variedade de síndromes em humanos, desde infecções superficiais até invasoras, principalmente em imunocomprometidos. Para compreender o prognóstico, a epidemiologia e a terapêutica é essencial que se identifique corretamente as diferentes espécies etiológicas.

A rotina para identificação das leveduras envolve além do exame da colônia e morfologia microscópica, várias reações bioquímicas. *C. albicans*, a espécie mais freqüente em materiais biológicos, tem sido identificada apenas pela produção de tubo germinativo em soro e produção de clamidosporos em ágar fubá acrescido de Tween 80. Outras espécies necessitam de provas de assimilação e fermentação de carbono que por sua vez consomem tempo, são trabalhosos e complexos^{3,5} apesar de alguns esquemas simplificados, baseados nesses princípios, terem sido propostos para identificação rápida de algumas delas⁵.

Atualmente são comercializados painéis manuais e automatizados para identificação de leveduras, através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos

os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor^{2,4,6,7,8}.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o sistema comercial API20C AUX utilizando as diferentes espécies de leveduras previamente identificadas pela metodologia clássica.

Organismos testados. Selecionou-se para investigação, 50 leveduras incluindo os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* obtidas de culturas de diversos materiais biológicos humanos. Todos os isolados foram testados pela metodologia clássica e reidentificadas pelo sistema API20C AUX.

Metodologia clássica: os isolados de *C. albicans* foram confirmados pela produção de tubo germinativo em soro bovino e produção de clamidosporos em ágar fubá acrescido de tween 80. Para exclusão de uma possível *C. dubliniensis* verificou-se a presença ou não de crescimento a 45°C. Para identificação das outras espécies de *Candida*, utilizou-se além das características morfológicas em ágar fubá acrescido de tween 80, provas de assimilação e fermentação de diferentes carboidratos. Assimilação

1. Laboratório I de Ribeirão Preto do Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP. 2. Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Endereço para correspondência: Dra. Jaqueline Otero Silva. R. Minas 877, Campos Eliseos, 14085-410 Ribeirão Preto, SP.

Tel: 55 16 625-5046; Fax: 55 16, 635-7994

e-mail: jaquelineos@ig.com.br

Recebido para publicação em 10/3/2004

Aceito em 2/3/2005

de nitrato, produção das enzimas urease e fenoxidase foram utilizadas quando necessárias.

Sistema API 20C AUX: porção do crescimento de cada colônia bem isolada em ágar Sabouraud dextrose e de cultivo de 24-48 horas foi assepticamente transferida para tubos contendo 1mL de solução fisiológica esterilizada e ajustado a uma turbidez equivalente à escala 2 de McFarland. Uma gota desta suspensão foi adicionada ao meio basal do API20C AUX e homogeneizado preenchendo, posteriormente, cada poço do painel de identificação. O painel foi incubado em câmara úmida, previamente preparada, a 30°C, por até 72 horas, com leituras de 24, 48 e 72 horas. Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de opacidade nos poços de cada carboidrato. Obteve-se um código de sete dígitos, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do catálogo analítico API20C AUX. Identificações listadas no index como excelente (%id \geq 99,9 e T \geq 0,75), muito boa (%id \geq 99,0 e T \geq 0,5), ou aceitável (%id \geq 90,0 e T \geq 0,5), foram consideradas corretas¹.

O sistema API20C AUX identificou corretamente 92% (46) das leveduras, sendo que 76% (38) não necessitaram de testes adicionais e em 16% (8) foram necessários a inclusão dos mesmos. Resultados estes próximos aos de Sand e Rennie⁶ que encontraram 96,5% de acurácia após 72 horas, quando da inclusão de testes extras. Melhores resultados foram obtidos por Smith et al⁸ que encontraram 95,6% de identificação sem adição de testes extras.

Foram observados problemas com a habilidade do sistema API20C AUX identificar corretamente *C. krusei* sem a necessidade de testes suplementares (Tabela 1). Wadlin et al⁹,

também, encontraram dificuldades com o sistema, em identificar 23 isolados de *C. krusei*.

O sistema comercial não identificou uma *R. rubra* (*R. mucilaginosa*) e uma *C. zeylanoides*, contudo uma *Candida* sp e um *Trichosporon* sp, não identificados como espécie pela metodologia clássica foram identificadas pelo sistema API20C AUX como *C. rugosa* e *T. asahii*, respectivamente (Tabela 1).

Smith et al⁸ encontraram dificuldade em identificar *C. zeylanoides* (3/3) pelo sistema API20C.

Foram obtidos os perfis numéricos de identificação, resultantes das reações bioquímicas desenvolvidas no sistema e analisados de acordo com o catálogo analítico¹ (Tabela 2). As identificações da maioria das cepas foram interpretadas pelo sistema como boa, muito boa e excelente. Quando o sistema ofereceu a possibilidade de duas espécies (Tabela 2), as características morfológicas foram fundamentais para diferenciação das mesmas.

Smith et al⁸ encontraram superioridade do API20C AUX quando da comparação com o sistema RYP e concluíram que este fato foi devido à utilização do estudo morfológico em microcultivo, conforme recomendado pelo fabricante do sistema API 20C AUX.

Quanto aos dois isolados (*C. coliculosa* e *C. utilis*) que apresentaram resultados de identificação divergentes da metodologia clássica (respectivamente, *C. bombii* e *C. fabiani*), observou-se que foram corretos quanto ao gênero.

Fenn et al² verificaram acurácia de 100% do sistema API 20C em relação à identificação dos gêneros.

Na presente pesquisa, o sistema falhou em discriminar o gênero em duas ocasiões, respectivamente *P. wicherhanii* x

Tabela 1 - Identificação das 50 leveduras pelo sistema API 20C AUX

Espécies	Avaliadas	Corretamente identificadas	Identificadas com testes extras	Não identificadas	Incorretamente identificadas
<i>Candida albicans</i>	4	4	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	6	6	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	3	2	-	1	-
<i>Candida krusei</i>	3	-	3	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	5	3	2	-	-
<i>Candida glabrata</i>	6	5	1	-	-
<i>Candida bombii</i>	1	-	-	-	1
<i>Candida fabiani</i>	1	-	-	-	1
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i> var <i>membranifaciens</i>	1	-	1	-	-
<i>Candida</i> sp ^a	1	1	-	-	-
<i>Pichia anomala</i>	1	-	1	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	4	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	1	-	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i> ^b	4	3	-	1	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	1	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	-	-	-
<i>Trichosporon inkin</i>	1	1	-	-	-
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	1	-	-	-
<i>Trichosporon</i> sp ^c	1	1	-	-	-
Total	50	38	8	2	2

consideradas como ^a*Candida rugosa*; ^b*Rhodotorula mucilaginosa*; ^c*Trichosporon asahii* em data base do sistema.

Tabela 2 - Perfil de identificação das leveduras através do sistema API20C AUX

Identificação clássica		Sistema API20C AUX		
Espécie (nº)	perfil numérico	espécie	cepas nº	acerto (%)
<i>Candida albicans</i> (4)	2576174	<i>Candida albicans</i> (1)	2	97,4
	6576174	<i>Candida albicans</i> (1)	1	98,2
	2542134	<i>Candida albicans</i> (2)	1	97,4
<i>Candida parapsilosis</i> (6)	6756175	<i>Candida parapsilosis</i>	4	99,9
	6552135	<i>Candida parapsilosis</i>	1	99,9
	6752135	<i>Candida parapsilosis</i>	1	99,7
<i>Candida zeylanoides</i> (3)	6102140	<i>Candida zeylanoides</i>	2	99,9
	6752344	não identificada	1	
<i>Candida krusei</i> (3)	6000104	<i>Candida krusei</i> / <i>inconspicua</i>	3	96,3
<i>Candida guilliermondii</i>				
var. <i>guilliermondii</i> (4)	6776376	<i>Candida guilliermondii</i>	1	99,6
	6776277	<i>Candida guilliermondii</i>	1	99,6
	6736377	<i>Candida guilliermondii</i>	1	99,7
	6756377	<i>Candida guilliermondii</i>	1	98,9
<i>Candida guilliermondii</i>				
var. <i>membranifaciens</i> (1)	6146376	<i>Pichia ohmeri</i>	1	99,9
<i>Candida bombi</i> (1)	610062	<i>Candida coliculosa</i>	1	96,9
<i>Candida fabiani</i> (1)	6400237	<i>Candida utilis</i>	1	99,8
<i>Candida</i> sp (1)	6462004	<i>Candida rugosa</i> / <i>Candida boidinii</i>	1	77,9/21,2
<i>Candida tropicalis</i> (5)	2556175	<i>Candida tropicalis</i>	3	95,9
	2556375	<i>Candida tropicalis</i> ou <i>Candida lusitanae</i>	2	89,4 - 10,5
<i>Candida glabrata</i> (6)	2000040	<i>Candida glabrata</i>	5	99,4
	6000040	<i>Candida glabrata</i> ou <i>Pichia wicherhanii</i>	1	29,3 - 70,7
<i>Cryptococcus albidus</i> (1)	2704273	<i>Cryptococcus albidus</i>	1	99,9
<i>Pichia anomala</i> (1)	6404071	<i>Candida peliculosa</i>	1	98,2
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> (4)	2040014	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	1	99,4
	2044073	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	1	99,9
	2040022	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	1	81,3
	2040032	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	1	98,7
<i>Rhodotorula rubra</i> (4)	6640073	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2)	2	99,9
	2642073	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2)	1	99,9
	6640033	não identificada	1	-
<i>Rhodotorula minuta</i> (1)	6700060	<i>Rhodotorula minuta</i>	1	99,9
<i>Trichosporon asahii</i> (1)	2744774	<i>Trichosporon asahii</i>	1	99,9
<i>Trichosporon inkin</i> (1)	2545775	<i>Trichosporon inkin</i>	1	99,9
<i>Trichosporon mucoides</i> (1)	6745776	<i>Trichosporon mucoides</i> ou <i>Cryptococcus humicolus</i>	1	67,3 - 32,1
<i>Trichosporon</i> sp (1)	2744775	<i>Trichosporon asahii</i>	1	99,9

C. glabrata e *T. mucoides* x *C. humicolus*, sendo a morfologia macroscópica primordial na identificação (Tabela 2).

O sistema comercial API20C AUX ofereceu todas as vantagens de armazenamento, estabilidade, reprodutibilidade e facilidade de uso oferecendo resultados em 72 horas. Porém, apresenta limitações por depender muitas vezes de provas suplementares para completa identificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Catalogue Analytique: API 20C AUX, 3ª edição Biomerieux, 1997.
- Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carrol K. Comparison of update Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification systems. *Journal Clinical Microbiology* 32: 1184-1187, 1994.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica* 8ª edição São Paulo Editora Sarvier, São Paulo, p.175-176, 187-190, 546, 561, 557, 586, 1991.
- Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *Journal Clinical Microbiology* 10: 357-364, 1979.
- Lopes J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich AC, Pacot A, Cuisenier B, Vagner O, Bonnin A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trealose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. *Journal Clinical Microbiology* 39:1172-1174, 2001.
- Sand C, Rennie RP. Comparison of three commercial systems for the identification of germ-tube negative yeast species isolated from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases* 33: 223-229, 1999.
- Sheppard DC, René P, Harris AD, Miller MA, Laverdière M, Souza E, Robson HG. Simple strategy for direct identification of medically important yeast species from positive blood culture vials. *Journal Clinical Microbiology* 37: 2040-2041, 1999.
- Smith MB, Dunklee D, Hangna Vu, Woods GL. Comparative performance of the RapID yeast plus system and the API 20C AUX clinical yeast system. *Journal Clinical Microbiology* 37: 2697-2698, 1999.
- 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. *Journal Clinical Microbiology* 37: 1967-1970, 1999.