



Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*

Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz¹, Guillermo Quindós², Carmen Delia Cárdenes³, Rocío Alonso Vargas², Pilar Arévalo³, Sonia Brió¹ y Lucila Madariaga²

¹Departamento de Microbiología, ACIA, Barcelona; ²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³Cátedra de Salud Pública y Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, Universidad de la Laguna, Tenerife; España

Resumen

Se ha evaluado la utilidad del medio Chromalbicans Agar (Biolife Italiana, Milán, Italia) para la identificación presuntiva de *Candida albicans* con 723 aislamientos clínicos y cepas de colección de diferentes géneros de levaduras de interés médico que incluían *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* y *Zygosaccharomyces*. La identificación se confirmó con pruebas de producción de tubo germinal en suero y asimilación de sustratos carbonados mediante el sistema API-ATB ID 32C (bioMérieux, Francia). El aislamiento en el medio Chromalbicans Agar fue de gran utilidad en la identificación presuntiva de *C. albicans*, con unos altos valores de sensibilidad y especificidad (> 97%), encontrándose muy pocos aislamientos falsos negativos o falsos positivos.

Palabras clave

Chromalbicans Agar, Agar cromógeno, ATB ID 32C, Levaduras, *Candida albicans*, Identificación presuntiva

Evaluation of Chromalbicans Agar for presumptive identification of *Candida albicans*

Summary

The utility of Chromalbicans Agar (Biolife Italiana, Milano, Italy) was evaluated with 723 clinical isolates and type culture collection strains from different genera including *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* and *Zygosaccharomyces*. Presumptive identification was confirmed by germ tube test and carbohydrate assimilation on API-ATB ID 32C (bioMérieux, France). Growth on Chromalbicans Agar was very useful for the presumptive identification of *C. albicans* isolates, and sensitivity and specificity values were significantly high (> 97%), since a very low number of isolates were found to be false negative or false positive.

Key words

Chromalbicans Agar, Chromogenic agar, ATB ID 32C, Yeasts, *Candida albicans*, Presumptive identification

Las micosis invasoras han aumentado de forma constante en las últimas décadas y constituyen un importante problema médico. Estas micosis son causadas mayoritariamente por levaduras pertenecientes al género *Candida*. *Candida albicans* es la especie fúngica más frecuentemente aislada, pero otras especies, resistentes en muchos casos al tratamiento antifúngico, están emergiendo como agentes etiológicos. Estos hechos hacen suma-

mente importante y necesario realizar un diagnóstico rápido y preciso de las candidiasis que permita conocer la identidad de la especie implicada para poder instaurar un tratamiento antifúngico correcto [1-4].

El agar glucosado de Sabouraud con antibióticos antibacterianos es una alternativa válida para el aislamiento de hongos patógenos. Sin embargo, la detección de infecciones mixtas o la identificación presuntiva del aislamiento en base a su morfología colonial son difíciles en este medio que no ha sido diseñado con esta finalidad. Los métodos de identificación de levaduras de interés clínico se basan en el estudio de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas obtenidas en el cultivo junto con los patrones bioquímicos de asimilación de azúcares [5]. Estos métodos requieren uno o más días para su correcta interpretación porque emplean colonias previamente aisladas que retrasan esta identificación. El desarrollo de pruebas de identificación presuntiva para *C. albicans*, como la filamentación o producción de tubo germinal en suero, han permitido reducir el tiempo de identificación y el coste económico, al hacer innecesarios ensayos bioquímicos posteriores para la identificación de

Dirección para correspondencia:
Dr. Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz
Apdo. Postal 10178
08080 Barcelona, España
Tel. / Fax: +34 93 429 7120
E-mail: acarrillo17@terra.es

Aceptado para publicación el 23 de Mayo de 2001

©2001 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

una gran mayoría de los aislamientos clínicos de levaduras. Además, se han comercializado varios medios de cultivo cromógenos (Albicans ID y Candida ID -bioMérieux, Francia-, CHROMagar Candida -CHROMagar Company, Francia- o Chromalbicans Agar -Biolife Italiana, Italia-) [6-17] que permiten una identificación presuntiva de *C. albicans* mediante la observación del color y la textura de las colonias aisladas en estos medios sólidos. El Chromalbicans Agar es un medio selectivo cromógeno en el que las colonias de *C. albicans* producen un pigmento de color azul que no aparece en las colonias del resto de las especies de levaduras de interés médico.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la eficacia de las placas de Chromalbicans Agar como método rápido de identificación presuntiva de *C. albicans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. Se estudiaron un total de 709 aislamientos clínicos y 14 cepas de colección, pertenecientes a más de 20 especies fúngicas: *C. albicans* (n=309), *Candida tropicalis* (n=105), *Candida parapsilosis* (n=96), *Candida glabrata* (n=37), *Candida dubliniensis* (n=35), *Candida krusei* (n=26), *Candida lusitanae* (n=17), *Candida guilliermondii* (n=15), *Candida famata* (n=14), *Candida intermedia* (n=6), *Candida lambica* (n=8), *Candida lipolytica* (n=5), otras especies de *Candida* (n=14), *Cryptococcus neoformans* (n=11), otras especies de *Cryptococcus* (n=2), *Pichia* spp. (n=4), *Rhodotorula* spp. (n=10), *Saccharomyces* spp. (n=5), *Trichosporon* spp. (n=3) y *Zygosaccharomyces* spp. (n=1). Se incluyeron también 14 cepas de referencia pertenecientes a la Colecciones Española (CECT) y Americana (*American Type Culture Collection* -ATCC-) de Cultivos Tipo (Tabla 1).

Tabla 1. Pigmentación de las colonias de cepas de referencia en medio cromogénico Chromalbicans Agar.

Identificación	Referencia	Color colonias
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64548	Azul
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64125	Azul
<i>Candida albicans</i>	ATCC 1001	Azul
<i>Candida albicans</i>	ATCC 76615	Azul
<i>Candida albicans</i>	CECT 1687	Azul
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 200950	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 200952	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 200953	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 42720	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 64125	Blanco
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 66035	Blanco
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Blanco
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 90018	Blanco

Inoculación e incubación. Todos los aislamientos, codificados para que el resultado de la identificación no influyese en la lectura e interpretación de los resultados, se sembraron en placas de agar glucosado de Sabouraud que se incubaron durante 24-48 h a 30 °C. Posteriormente, de tres a cuatro colonias de cada aislamiento fueron inoculadas en placas de Chromalbicans Agar y se incubaron durante 24-72 h a 37 °C. Después de la incubación, se procedió a su interpretación según el color, textura y otras características macroscópicas de las colonias.

Chromalbicans Agar. Las placas de Chromalbicans Agar están comercializadas por Biolife Italiana (Milán, Italia), aunque también pueden prepararse a partir de

medio deshidratado y su composición por litro de agua es la siguiente: factores de crecimiento 18,5 g, cloranfenicol 0,05 g, gentamicina 0,1 g, triptona 20 g, sustrato cromógeno 0,1 g, glucosa 1 g y agar 13 g. El pH del medio es $6 \pm 0,2$. Cuando los sustratos son hidrolizados por las hexosaminidasas correspondientes permiten la identificación específica de las colonias de *C. albicans* en base a su color azulado (Figura 1).

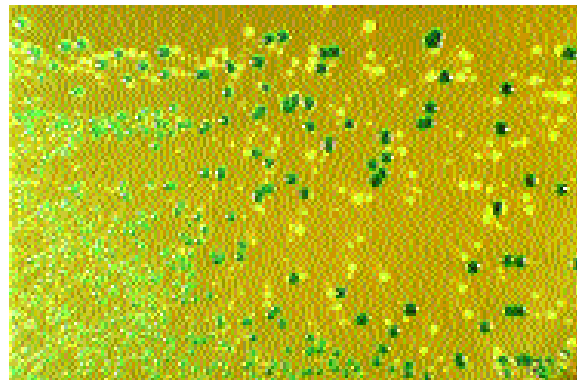


Figura 1. Aspecto desarrollado por colonias crecidas en Chromalbicans Agar (37 °C, 24h). Las colonias de *C. albicans* desarrollan una pigmentación azul uniforme; las de *C. tropicalis* son blancas y de tamaño menor mientras que las de otras especies de *Candida* son blancas y pequeñas. Por cortesía del Dr. F. Carozzi (Biolife Italiana, Italia).

Identificación de referencia. Los aislamientos estudiados fueron identificados por métodos micológicos convencionales que incluían la prueba de producción de tubo germinal en suero de caballo después de una incubación de 2 a 3 h a 37 °C [18] y asimilación de fuentes de carbono con el método comercial API-ATB ID 32C (bioMérieux, Marçí l'Etoile, Francia). La identificación de *C. dubliniensis* se realizó por inmunofluorescencia indirecta según la técnica descrita por Bikandi *et al.* [19] a partir de aislamientos clínicos que previamente habían sido identificados como *C. albicans*.

Evaluación de la utilidad. Para la valoración de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos de las pruebas positiva y negativa y la eficiencia del Chromalbicans Agar en la identificación de *C. albicans*, se utilizaron las fórmulas siguientes [20]:

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{PV}{PV + FN} \times 100$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{NV}{NV + FP} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de la prueba positiva (\%)} = \frac{PV}{PV + FP} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo de la prueba negativa (\%)} = \frac{NV}{NV + FN} \times 100$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{PV + NV}{PV + FP + NV + FN} \times 100$$

donde:

PV = positivos verdaderos
 FP = falsos positivos
 NV = negativos verdaderos
 FN = falsos negativos

RESULTADOS

El crecimiento en Chromalbicans Agar fue rápido (18-24 h) para la mayoría de las especies estudiadas. Las colonias azules de *C. albicans* se diferenciaban de forma sencilla después de este periodo de incubación y todas las cepas de referencia incluidas en el estudio fueron correctamente discriminadas e identificadas. De los 723 aislamientos estudiados, 343 mostraron colonias de color azul, de los que 299 correspondían a *C. albicans*, 35 a *C. dubliniensis*, dos a *C. lusitaniae* y siete aislamientos pertenecieron a otras tantas especies (*Candida pulcherrima*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Saccharomyces* spp. y *Trichosporon* spp.) (Tabla 2). Por otro lado, varios de los aislamientos identificados como *C. tropicalis* por la técnica de referencia y que en el medio cromogénico producían colonias de color blanco presentaban una ligera pigmentación azulada que contrastaba con las colonias de color azul uniforme de *C. albicans*.

Tabla 2. Pigmentación de colonias obtenida en la identificación de 723 levaduras en medio cromogénico Chromalbicans Agar.

Levadura	Colonias azules	Colonias blancas	Total (%)
<i>Candida albicans</i>	299	10	309 (42,74)
<i>Candida dubliniensis</i>	35	0	35 (4,84)
<i>Candida famata</i>	0	14	14 (1,94)
<i>Candida glabrata</i>	1	36	37 (5,12)
<i>Candida globosa</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Candida guilliermondii</i>	1	14	15 (2,07)
<i>Candida holmii</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Candida humicola</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Candida inconspicua</i>	0	2	2 (0,28)
<i>Candida intermedia</i>	0	6	6 (0,83)
<i>Candida kefyr</i>	0	2	2 (0,28)
<i>Candida krusei</i>	1	25	26 (3,6)
<i>Candida lambica</i>	0	8	8 (1,11)
<i>Candida lusitaniae</i>	2	15	17 (2,35)
<i>Candida lipolytica</i>	0	5	5 (0,69)
<i>Candida melibiosica</i>	0	2	2 (0,28)
<i>Candida norvegensis</i>	0	2	2 (0,28)
<i>Candida parapsilosis</i>	0	96	96 (13,28)
<i>Candida pulcherrima</i>	1	0	1 (0,14)
<i>Candida rugosa</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Candida tropicalis</i>	0	105	105 (14,52)
<i>Candida valida</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	1	1 (0,14)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	11	11 (1,52)
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	1	0	1 (0,14)
<i>Pichia</i> spp.	0	4	4 (0,55)
<i>Rhodotorula</i> spp.	0	10	10 (1,38)
<i>Saccharomyces</i> spp.	1	4	5 (0,69)
<i>Trichosporon</i> spp.	1	2	3 (0,41)
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	0	1	1 (0,14)
Total	343	380	723 (100)

Para evaluar la utilidad de la técnica en identificar *C. albicans*, se consideró que 343 resultados eran positivos verdaderos (incluyendo los aislamientos de *C. dubliniensis*), 370 negativos verdaderos, 10 falsos negativos y nueve falsos positivos (Tabla 2) que daban a la interpretación como *C. albicans* de las colonias azules, una sensibilidad del 97,09%, una especificidad del 97,63%, una eficiencia del 97,37% y unos valores predictivos de las pruebas positiva y negativa del 97,38% y del 97,37%, respectivamente. La concordancia obtenida (índice Kappa) entre el medio Chromalbicans Agar y los métodos de referencia de identificación fue de 0,947, no observándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre métodos para la discriminación de *C. albicans* del resto de especies utilizadas en el estudio.

DISCUSIÓN

La identificación presuntiva de *C. albicans* resulta de gran utilidad debido a que alrededor del 70% de los aislamientos clínicos de levaduras pertenecen a esta especie [1-3]. La utilización de los medios que contienen sustratos de las hexosaminidasas ha supuesto un gran avance en el laboratorio de Microbiología clínica por poseer una utilidad mayor que otros medios tradicionales de aislamiento e identificación rápida de *C. albicans* [6-17]. Un nuevo y prometedor ejemplo de estos medios es el Chromalbicans Agar que emplea una mezcla cromógena que permite visualizar de forma eficaz y rápida las colonias pertenecientes a *C. albicans* y diferenciarlas de otras especies de levaduras de interés médico. En el presente estudio, hemos observado con este medio que la sensibilidad y la especificidad (97,09 y 97,63%, respectivamente) son excelentes para la identificación de *C. albicans* y que se observan muy pocos resultados falsos positivos o negativos. Diez aislamientos de *C. albicans* no formaron colonias azules y en cambio, sí lo hicieron dos aislamientos de *C. lusitaniae* y un aislamiento de cada una de las especies siguientes de *Candida*, *C. pulcherrima*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y un aislamiento de *C. uniguttulatus*, uno de *Saccharomyces* spp. y otro de *Trichosporon* spp.

Las técnicas convencionales de identificación de *C. albicans*, como la producción de tubo germinal en suero o de clamidosporos en agar extracto de maíz o de arroz, presentan un porcentaje variable de falsos negativos (entre 5 y 10%). De considerarse cierta inestabilidad genética que se produciría en las cepas de colección atribuible al procedimiento de conservación y sucesivos subcultivos. De este modo, la producción de clamidosporos quedaría limitada o incluso ausente en algunas cepas [21] y podría explicar la aparición de colonias blancas de cepas identificadas como *C. albicans*. Por otro lado, otras especies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus gastricus* o, la recientemente descrita, *C. dubliniensis* [4,12,13,16], pueden producir tubos germinales y/o clamidosporos. Estos dos métodos requieren experiencia para su interpretación, lo que plantea problemas en aquellos laboratorios de Microbiología clínica poco familiarizados con los hongos. Además, el medio Chromalbicans Agar permite identificar a los aislamientos de *C. albicans* que no producen tubo germinal o clamidosporos. En nuestro estudio, los escasos aislamientos ($n=12$) de esta especie que no producían tubo germinal en suero de caballo formaban colonias azules en Chromalbicans Agar. Por el contrario dos cepas que desarrollaron color blanco en el medio Chromalbicans Agar y que fueron identificadas como *C. albicans* no producían tubo germinativo en el test de filamentación.

La ligera pigmentación azulada que se observaba con algunas colonias de la especie *C. tropicalis* en el medio Chromalbicans Agar, no planteaba el problema suscitado por los falsos positivos observados por Lipperheide *et al.* [12] con esta especie en el medio Albicans ID (la mitad de los aislamientos formaban colonias azules). Estos autores [12] también observaron falsos positivos con algunos aislamientos de *C. lusitaniae* y *T. beigeli*. En el presente estudio, dos de los 17 aislamientos estudiados de *C. lusitaniae* también daban falsos positivos en Chromalbicans Agar y lo mismo ocurría con un aislamiento del género *Trichosporon*.

En nuestro estudio, encontramos una excelente concordancia entre los métodos utilizados en la discriminación de *C. albicans* del resto de levaduras, obteniendo una coincidencia de identificaciones correctas en el

97,38% de los aislamientos. La mayoría de los estudios con medios cromógenos [4,5] han mostrado valores de eficacia muy similares y superiores al 95% para la mayoría de los parámetros evaluados, por lo que también debemos tener en cuenta otros factores a la hora de decidir qué medio emplear en el laboratorio clínico. Un factor importante en la utilización de un método comercializado es su coste económico. Los medios cromógenos son más caros que el agar glucosado de Sabouraud, pero su utilidad y productividad se incrementan con las muestras clínicas con mayores posibilidades de contener más de una especie de levadura (muestras orofaríngeas, respiratorias y genitales) y con la potencial identificación de *C. albicans* en un porcentaje elevado de las mismas que ahorra posteriores pruebas de laboratorio que encarecen la identificación de los aislamientos. Por otra parte, dentro de las técnicas de identificación rápida de *C. albicans*, la prueba de filamentación en suero es la más barata respecto a los materiales necesarios. Sin embargo, esta prueba se ve encarecida desde el punto de vista del procesado de laboratorio por requerir más tiempo de dedicación de personal cualificado [5].

Los resultados expuestos en el estudio, indican que el medio Chromalbicans Agar permite una excelente discriminación de las colonias de *C. albicans* y de otras espe-

cies de levaduras de interés médico. Sin embargo, hay que asumir que para la identificación de *C. dubliniensis* es necesario emplear métodos adicionales, puesto que Chromalbicans Agar no permite diferenciar esta especie de *C. albicans* basándose en las características de las colonias, ya que las de ambas especies presentan el mismo color y parecida textura. La importancia de este patógeno oportunista sobre el resto de levaduras es evidente en nuestro entorno, si bien otras especies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* acompañan a *C. albicans* dentro del grupo de levaduras de mayor importancia clínica en la actualidad. Se hace necesario disponer de una técnica que permita una discriminación eficaz en un periodo de tiempo lo suficientemente corto y que sea asequible para el laboratorio como método de selección de aquellas levaduras, que deban pasar a ser identificadas de forma completa por métodos más costosos, complicados y con un mayor tiempo de espera. Por los motivos expuestos, Chromalbicans Agar puede ser utilizado con seguridad para el procesado de muestras clínicas en las que se sospecha la presencia de levaduras del género *Candida* como agente etiológico potencial.

Agradecemos al Dr. Carozzi (Biolife Italiana, Milán, Italia) y al Sr. Gabriel Cardona (Biocheck S.A.) por el soporte técnico y la cesión de parte del material utilizado en la realización del estudio. Este trabajo ha sido financiado parcialmente con el proyecto UPV 093.327-EB157/99 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

Bibliografía

- LaRocco MT, Burgert SJ. Fungal infections in the transplant recipient and laboratory methods for diagnosis. Rev Iberoam Micol 1997; 14:143-146.
- Trick WE, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infection in the 1990s. Rev Iberoam Micol 1998;15:2-6.
- Sandven P. Epidemiology of candidemia. Rev Iberoam Micol 2000;17:73-81.
- Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP, et al. In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. Chemotherapy 2000;46:395-401.
- Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001;39:9-33.
- Baumgartner C, Freydière A-M, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates. J Clin Microbiol 1996;34:454-456.
- Buchaille L, Freydière AM, Guinet R, Gille Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:479-488.
- Contreras I, San-Millán R, Barrasa A, Pontón J, Quindós G. Utility of Albicans ID plate for rapid identification of *Candida albicans* in clinical samples. Mycopathologia 1996;136:17-20.
- Freydière AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:464-467.
- Fricker-Hidalgo H, Orensa S, Lebeau B, et al. Evaluation of Candida ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. J Clin Microbiol 2001;39:1647-1649.
- Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:188-191.
- Lipperheide V, Andracka L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of the Albicans ID® plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. Mycoses 1993;36:417-420.
- Quindós G, Lipperheide V, Pontón J. Evaluation of two commercialized systems for the rapid identification of medically important yeasts. Mycoses 1993;36:299-303.
- Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Martín-Mazuelos E, Negroni R. Evaluación micológica 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 2001;18:23-28.
- San-Millán R, Ribacoba L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:153-158.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995;141:1507-1521.
- Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachmkín I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 1999;37:1967-1970.
- Mackenzie DWR. Serum germ tube identification of *Candida albicans*. J Clin Pathol 1962;15:563-565.
- Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. J Clin Microbiol 1998;36:2428-2433.
- Kramer M, Feinstein A. Clinical bioestatics. The bioestatistic of concordance. Clin Pharmacol Ther 1981;29:111-112.