



INFORME BREVE

Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*

María E. Ochiuzzi^{a,*}, Silvana Cataldi^b, Liliana Guelfand^b, Ivana Maldonado^b, Alicia Arechavala^b y Red de Micología CABA, Argentina^{*}

^a Sección Microbiología, Laboratorio Central, Hospital General de Agudos Dr C.G. Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Red de Micología CABA, Argentina

Recibido el 4 de septiembre de 2013; aceptado el 27 de febrero de 2014

PALABRAS CLAVE

Vitek 2;
Identificación;
Candida spp.

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar el desempeño de las tarjetas YST del sistema Vitek 2 para la identificación de levaduras del género *Candida*. Se analizaron 168 aislamientos; los resultados fueron comparados con los obtenidos por los equipos API 20C AUX (24 %) o API ID 32C (76 %). Cada cepa se subcultivó en agar cromogénico para levaduras y se observó la micromorfología. *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron identificadas a través de pruebas bioquímicas y moleculares adicionales. La concordancia observada fue del 98,3 %. Solo tres cepas no fueron identificadas correctamente por el sistema Vitek 2: una cepa de *C. tropicalis* y una de *C. krusei* fueron identificadas erróneamente como *C. parapsilosis* y otra cepa de *C. krusei* fue identificada de manera incompleta por el software del equipo. El tiempo promedio de identificación con las tarjetas YST fue de 18,25 h. El sistema Vitek 2 surge como un método confiable, simple y efectivo para la identificación de las principales especies del género *Candida*.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Vitek 2;
Identification;
Candida spp

Evaluation of Vitek 2 for the identification of *Candida* yeasts

Abstract

The aim of this investigation was to evaluate the performance of Vitek 2 YST cards (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, USA) for the identification of yeasts of the genus *Candida*. A total of 168 isolates were analyzed and the results were compared to those of the API 20C AUX (24%) o API ID 32C (76%) kits (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Each isolate was grown in chromogenic agar and in corn meal agar (Oxoid, UK) to observe its

* Los integrantes de la Red de Micología CABA están relacionados en el anexo.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: omarieu@hotmail.com (M.E. Ochiuzzi).

micromorphology. *C. albicans* and *C. dubliniensis* were identified by additional biochemical and molecular tests. The agreement observed was 98.3%. Only three isolates were incorrectly identified by Vitek 2: one strain of *C. tropicalis* and one strain of *C. krusei* were identified as *C. parapsilosis* by YST while one strain of *C. krusei* was identified with low discrimination. The average time for obtaining results was 18.25 h. Vitek 2 is a simple, safe and useful system for the identification of significant *Candida* species.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Las levaduras del género *Candida* constituyen la principal causa de infecciones fúngicas invasoras en pacientes hospitalizados^{3,4}. Diversos estudios señalan un cambio en la etiología de estas infecciones, con una disminución de *Candida albicans* y un marcado aumento del resto de las especies^{2,6,10}. En un estudio multicéntrico realizado en los hospitales de la Ciudad de Buenos Aires (Argentina), López Moral *et al.*⁸ señalaron que en hemocultivos, la distribución porcentual de las 4 especies más frecuentes (*C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*) no presentó variaciones durante el período 2005-2008, y detectaron pocos aislamientos de especies menos frecuentes, como *Candida pelliculosa*, *Candida dubliniensis*, *Candida rugosa*, *Candida intermedia*, *Candida sake*, *Candida holmii* y *Candida lusitanae*.

Por otra parte, se han identificado otros hongos levaduriformes como agentes etiológicos, los que generan cambios en la epidemiología y, por ende, en el adecuado abordaje del tratamiento antifúngico³. Las especies poco frecuentes del género *Candida* pueden presentar diversos patrones de sensibilidad, por lo tanto, es de suma importancia identificarlas correctamente y realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro*.

El sistema Vitek 2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, EE. UU.) es un equipo que identifica y establece el patrón de sensibilidad de diversos microorganismos. La tarjeta YST permite identificar levaduras de importancia clínica y organismos relacionados a través de 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos y ácidos orgánicos y detección de oxidasas y arilamidinas. Diversos estudios demostraron que mediante este sistema se puede identificar correctamente más del 93 % de las cepas analizadas en aproximadamente 18 horas^{1,5,9,13,14}. El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de las tarjetas YST del sistema Vitek 2 para la identificación de las levaduras del género *Candida* más frecuentes en la práctica asistencial.

Se estudiaron 164 aislamientos de *Candida* spp. provenientes de diversos materiales clínicos procesados en los hospitales integrantes de la Red de Micología de la Ciudad de Buenos Aires (CABA), Argentina, entre el 1 de septiembre de 2009 y el 31 de mayo de 2010. Se utilizaron como control de calidad las cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 y *C. albicans* ATCC 64548.

Los aislamientos fueron obtenidos de las siguientes muestras: sangre (40), catéteres (14), líquidos de punción (10), hisopados de fauces (18), esputos (8), uñas (12), flujos vaginales (10), orinas (41), biopsias (7) y otros sitios (4).

Las levaduras fueron identificadas por medio de los equipos API 20C AUX (24 %) o API ID 32C (76 %) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), de acuerdo a la disponibilidad de cada hospital de origen. El procedimiento se realizó según las indicaciones del fabricante. Todos los aislamientos fueron identificados con una probabilidad ≥ 90 %. Estos sistemas comerciales fueron considerados el método de referencia.

Se analizaron en total 168 cepas (164 de muestras clínicas y 4 cepas ATCC), que incluyeron 32 *C. parapsilosis*, 28 *C. glabrata*, 26 de *C. krusei*, 29 de *C. tropicalis*, 20 de *Candida guilliermondii*, 26 *C. albicans* y 7 *C. dubliniensis*.

Para confirmar la pureza de cada aislamiento, se subcultivó en agar cromogénico para levaduras (CHROMagar™ *Candida*, París, Francia), medio que contiene sustratos enzimáticos unidos a compuestos cromógenos que producen un color determinado en presencia de la enzima específica de algunas especies. También se inocularon en agar harina de maíz con 1 % de Tween 80 (corn-meal agar, Oxoid, Reino Unido)⁷, medio utilizado para observar la micromorfología de la levadura, la distribución de blastoconidios y la presencia de clamidoconidios y pseudomicelios.

Debido a que *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan un perfil morfológico y fenotípico similar, se utilizaron 5 pruebas bioquímicas adicionales para realizar la identificación presuntiva (crecimiento a 42 °C, desarrollo en medio con NaCl 11 %, agar opacidad, agar tabaco y asimilación de D-xilosa)¹¹, y posteriormente se confirmó la identidad por un estudio molecular (PCR convencional) en el que se amplificó la región codificante completa del *gen hwp1*, que codifica una adhesina de superficie. Se utilizaron las siguientes secuencias de primers: Fw 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3' y Rv 5'-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3'. La detección de los productos amplificados se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El tamaño de los fragmentos esperados era 941 pb (*C. albicans*) y 569 pb (*C. dubliniensis*)¹².

Se corroboró la identificación original de los 168 aislamientos utilizados en este estudio. En todos los casos, el color y el aspecto de las colonias en agar cromogénico fue el esperado para cada especie. De la misma manera, la micromorfología observada en el agar harina de maíz fue la esperada. Los aislamientos identificados presuntivamente como *C. albicans*-*C. dubliniensis* fueron confirmados mediante las pruebas fisiológicas, morfológicas y moleculares. Los 7 aislamientos de *C. dubliniensis* fueron identificados utilizando el sistema API ID 32C.

Antes de utilizar las tarjetas YST del sistema Vitek 2, cada aislamiento fue subcultivado en agar Sabouraud glucosado e incubado durante 48 h a 35 °C para asegurar su pureza y viabilidad. Se realizó luego un segundo repique en el

mismo medio de cultivo, que fue incubado durante 24 h. El inóculo de trabajo se preparó a partir de colonias de levaduras aisladas en 3 ml de solución fisiológica-agua destilada (1:1), hasta una turbidez equivalente a 1,8-2,2 de McFarland, utilizando el instrumento DensiCheck® provisto por bioMérieux, según las indicaciones del fabricante. El inóculo preparado se dispensó en la tarjeta YST a través de un tubo de poliestireno estéril. Los *cassettes* fueron colocados en el Vitek 2; las tarjetas se llenaron, incubaron y leyeron dentro del equipo. Los datos obtenidos de cada prueba fueron interpretados según la base de datos del instrumento, para tipificar al microorganismo en estudio. El resultado de la identificación final fue clasificado como "excelente", "muy bueno", "bueno", "aceptable" o "baja discriminación", según el porcentaje de discriminación dado por el *software* del equipo. El tiempo de incubación varió de 18,0 a 18,5 h (promedio: 18,25 h).

Los resultados de identificación obtenidos por el Vitek 2 se compararon con los de los equipos API 20C AUX o API ID 32C leídos a las 48 y 72 h de incubación. El porcentaje de concordancia fue del 98,3 %. En la tabla 1 se detallan los resultados obtenidos. Tres cepas no fueron identificadas correctamente por el sistema Vitek 2: una cepa de *C. tropicalis* y una de *C. krusei* fueron identificadas erróneamente como *C. parapsilosis* por la tarjeta YST. Otra cepa de *C. krusei* fue identificada de manera incompleta por el *software* del aparato, pero al analizar los resultados de cada prueba incluida en la tarjeta y utilizando la micromorfología y las tablas del libro de De Hoog *et al.*⁶, se logró su correcta identificación.

Se validaron los resultados de cada ensayo en función de los datos correspondientes a las cepas ATCC.

La experiencia de varios autores avala la utilidad de las tarjetas YST para identificar levaduras correspondientes a géneros distintos de *Candida*, como *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula spp.*, *Pichia farinosa*, *Trichosporon asahii* y *Geotrichum capitatum*, entre otros^{1,5,9,13,14}.

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio podemos concluir que el sistema Vitek 2 es un método confiable, simple y efectivo para la identificación de las principales especies del género *Candida*. Presenta una concordancia del 98,3 % con los equipos API 20C AUX o API ID 32C. Es importante mencionar que al utilizar pruebas adicionales recomendadas por el *software* del equipo, se logra identificar

las cepas que fueron catalogadas con baja discriminación, mejorando de este modo los resultados obtenidos^{1,5,13,14}. Asimismo, se reduce significativamente el tiempo necesario para obtener el resultado (de 48-72 h cuando se emplea API a 18,25 h con el sistema Vitek 2), en coincidencia con lo informado por otros trabajos^{1,5,9}.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Agradecimientos

Al personal de la Unidad Micología del Hospital de Infecciones "Dr. Francisco J. Muñoz", por haber realizado la PCR del *gen hwp1*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo. Integrantes de la Red de Micología CABA

Maldonado I, Hospital Alemán; Schijman M, Hospital General de Agudos Dr. T. Álvarez; López Moral L, Hospital General de Agudos Dr. C. Argerich; Rébora J, Hospital Borda; Relloso S, Instituto Universitario CEMIC; Cataldi S, Hospital General de Agudos Dr. C.G. Durand; Nápoli P, Hospital de Niños Dr. P. Elizalde; Fernández A, Fundación Favaloro; Gueffand L, Hospital General de Agudos J.A. Fernández; Arechavala A, Unidad Micología Hospital de Infecciones F.J. Muñoz; Bianchi M, Unidad Micología Hospital de Infecciones F.J. Muñoz;

Tabla 1 Especies identificadas por el sistema Vitek 2 y el equipo Api 20CAUX o Api ID32C

Especie	N.º de cepas identificadas por API	N.º de cepas identificadas por Vitek 2	% de discriminación con Vitek 2	N.º de cepas identificadas erróneamente con Vitek 2
<i>C. albicans</i>	27	27	94-99	
<i>C. tropicalis</i>	29	28	92-99	1
<i>C. glabrata</i>	29	29	93-99	
<i>C. parapsilosis</i>	33	33	95-99	
<i>C. krusei</i>	27	25	93-99	2
<i>C. dubliniensis</i>	7	7	94-96	
<i>C. guilliermondii</i>	20	20	93-99	

Romeo AM, Hospital General de Agudos Dr. J.M. Penna; Franco N, Hospital General de Agudos Dr. P. Piñero; Garbasz C, Hospital General de Agudos Dr. I. Pirovano; López M, Hospital General de Agudos Dr. Ramos Mejía; Madeo MC, Hospital General de Agudos Dr. Tornú; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Bibliografía

1. Aubertine C, Rivera M, Rohan S, Larone D. Comparative study of the new colorimetric Vitek 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol.* 2006;44:227-8.
2. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, Isla G, Davel G and the Red Nacional de Laboratorios de Micología, Argentina. Species distribution and susceptibility profile of yeast isolates from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43:176-85.
3. Cuenca Estrella M, Rodríguez-Tudela J, Córdoba S, Melhem M, Szesz M, Castañeda E, Martínez G, Gabastou JM. Red regional de laboratorios para la vigilancia de las infecciones fúngicas invasoras y susceptibilidad a los antifúngicos. *Rev Panam Salud Pública.* 2008;23:129-34.
4. Davel G, Canteros CE. Situación de la micosis en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:28-33.
5. Hata J, Hall L, Fothergill A, Larone D, Wengenack N. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1087-92.
6. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 3.^a ed. España, Centaalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira I Virgili; 2009.
7. Koehler A, Chu K, Houang E, Chemg A. Simple, reliable, and cost effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999;37:422-6.
8. Lopez Moral L, Tiraboschi I, Shijman M, Bianchi M, Guelfand L, Cataldi S e integrantes de la Red de Micología de la Ciudad de Buenos Aires. Fungemias en hospitales de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29:144-9.
9. Massonet C, Van Eldere J, Vaneechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of Vitek 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2209-11.
10. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling A and the Global Antifungal Surveillance Group. 2010. Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10,5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI Standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1366-77.
11. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40:211-7.
12. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discrimination between *Candida africana*, *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62:230-3.
13. Sanguinetti M, Porta R, Sali M, La Sorda M, Pecorini G, Fadda G, Posteraro B. Evaluation of Vitek 2 and RapID Yeast Plus System for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1343-6.
14. Valenza G, Strasen J, Schafer F, Frosch M, Kursai O, Abele-Horn M. Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *Notes. J Clin Microbiol.* 2008;46:3784-7.