

## **Estudio comparativo entre los sistemas automatizados Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® con los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras de interés clínico.**

*Giuseppe Ferrara<sup>1,2</sup>, María Mercedes Panizo<sup>1</sup>, Marja Mazzone<sup>2</sup>, Maria Delia Pequenese<sup>2</sup> y Vera Reviakina<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Departamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología, Centro Médico Loira. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** levaduras, identificación, Vitek YBC®, Microscan Walk Away RYID®.

**Resumen.** El objetivo de este trabajo fue comparar la identificación de levaduras de interés clínico por los métodos automatizados Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® con los métodos fenotípicos convencionales. Se utilizaron 193 aislamientos de levaduras provenientes de muestras clínicas y cinco cepas controles. Todas las levaduras fueron identificadas por los métodos automatizados antes nombrados y los métodos fenotípicos convencionales de asimilación de carbohidratos, visualización de la morfología microscópica con agar harina de maíz y el uso de agar cromogénico. Para evaluar las variables se utilizaron tablas de contingencia de 2×2, Chi cuadrado de Mc Nemar, el índice Kappa, y se calcularon los valores de concordancia, así como los errores mayores y menores de los métodos automatizados. Las levaduras se dividieron en dos grupos: 1) de aislamiento frecuente y 2) de aislamiento poco frecuente. Los sistemas Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® fueron concordantes en un 88,4 y 85,9% respectivamente, cuando se compararon con los métodos fenotípicos convencionales. Aunque ambos sistemas automatizados se pueden utilizar para la identificación de levaduras, la presencia de errores mayores y menores indica la posibilidad de identificaciones incorrectas, por lo tanto, el operador de estos equipos debe utilizar paralelamente pruebas fenotípicas como la visualización de la morfología microscópica en agar harina de maíz y el agar cromogénico, sobre todo frente a levaduras de aislamiento poco frecuente. Los sistemas automatizados son una herramienta valiosa,

sin embargo, la experiencia y el criterio del microbiólogo son una fortaleza importante para asegurar la calidad de los resultados.

**A comparative study between the Vitek YBC® and Microscan Walk Away RYID® automated systems with conventional phenotypic methods for the identification of yeasts of clinical interest.**

*Invest Clin 2014; 55(4): 297 - 310*

**Keywords:** yeasts, identification, Vitek YBC®, Microscan Walk Away RYID®.

**Abstract.** The aim of this study was to compare the identification of clinically relevant yeasts by the Vitek YBC® and Microscan Walk Away RYID® automated methods with conventional phenotypic methods. One hundred and ninety three yeast strains isolated from clinical samples and five controls strains were used. All the yeasts were identified by the automated methods previously mentioned and conventional phenotypic methods such as carbohydrate assimilation, visualization of microscopic morphology on corn meal agar and the use of chromogenic agar. Variables were assessed by 2×2 contingency tables, McNemar's Chi square, the Kappa index, and concordance values were calculated, as well as major and minor errors for the automated methods. Yeasts were divided into two groups: 1) frequent isolation and 2) rare isolation. The Vitek YBC® and Microscan Walk Away RYID® systems were concordant in 88.4 and 85.9% respectively, when compared to conventional phenotypic methods. Although both automated systems can be used for yeasts identification, the presence of major and minor errors indicates the possibility of misidentifications; therefore, the operator of this equipment must use in parallel, phenotypic tests such as visualization of microscopic morphology on corn meal agar and chromogenic agar, especially against infrequently isolated yeasts. Automated systems are a valuable tool; however, the expertise and judgment of the microbiologist are an important strength to ensure the quality of the results.

*Recibido: 11-11-2012 Aceptado: 26-6-2014*

## INTRODUCCIÓN

La identificación de levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios: morfológicos, fisiológicos, inmunológicos y genéticos (1-5). Los métodos basados en criterios morfológicos en su mayoría son rápidos, a excepción de la formación de ascosporas. Los más utilizados son la formación

de tubo germinal y la producción de clamidoconidias (1, 2, 5). Adicionalmente se dispone del método de Dalmau, que permite el estudio de la morfología microscópica en agar harina de maíz y de los medios de cultivo cromogénicos (1, 5-7].

Las pruebas más usadas para la identificación de levaduras según criterios fisiológicos son la ureasa y la fenol-oxidasa. La re-

sistencia a la cicloheximida y la termotolerancia se consideran pruebas complementarias (1, 3, 5). Los métodos fenotípicos convencionales basados en criterios bioquímicos son la asimilación de nutrientes (carbohidratos y fuentes de nitrógeno) y la fermentación de carbohidratos, originalmente desarrollados por Wickerham y Burton, respectivamente. Son técnicas costosas, laboriosas, que consumen mucho tiempo y sólo se realizan en laboratorios de referencia. El método de asimilación de Wickerham fue considerado en su momento como el “patrón oro” en la identificación taxonómica de levaduras; este método fue modificado por Huppert mediante el uso de discos de papel impregnados con los sustratos a estudiar, simplificando de esta manera su implementación en los laboratorios de rutina (1, 2, 8-10). Los métodos basados en criterios inmunológicos y moleculares han demostrado tener mayor sensibilidad, especificidad y rapidez para la identificación de levaduras; sin embargo, son costosos y, particularmente los moleculares, requieren no sólo de personal entrenado sino también de equipos especiales, sumado a la necesidad de estandarización de los procedimientos técnicos. Actualmente estos métodos se usan como herramientas complementarias a los métodos fenotípicos convencionales, suministrando resultados más confiables en menor tiempo, pero las premisas descritas anteriormente han limitado su implementación en los laboratorios de microbiología de rutina, sobre todo en países en vías de desarrollo (11, 12).

En las últimas décadas se han desarrollado métodos comerciales, manuales y automatizados, basados en la asimilación de nutrientes. Entre los comerciales de ejecución manual se encuentran API 20C®, API *Candida*®, Auxacolor®, Candifast®, Fungichrom®, Fungifast® y RapID Yeast Plus® (Remel); entre los comerciales automatizados se cuenta con Biolo YT Microplate®,

MIS Microbial ID® (análisis de ácidos grasos), ID32C®, Microscan Walk Away RYID® (Rapid Yeast Identification), Vitek YBC® (Yeast Biochemical Card) y Vitek 2 ID-YST®. Los cuatro últimos actualmente están disponibles en el mercado venezolano y al alcance de los laboratorios de microbiología, con ventajas importantes: son más rápidos que los métodos fenotípicos convencionales, fáciles de utilizar y poseen programas de computación (softwares) para la identificación de los diferentes microorganismos (2).

Los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras consumen un tiempo variable de 2 a 21 días; además requieren la utilización de claves de identificación que complican el proceso. Para lograr una identificación presuntiva adecuada deben ser acompañados de métodos morfológicos y fisiológicos. Los métodos automatizados pueden identificar levaduras entre 4 a 48 horas, lo cual representa una gran ventaja para el laboratorio y el manejo clínico del paciente, pero estos métodos no han podido sustituir por completo a los convencionales (1-5). Los métodos moleculares por su parte, permiten identificar especies crípticas y diferenciar entre especies genéticamente relacionadas, casos en que los métodos convencionales fenotípicos y automatizados no ofrecen precisión (13). Debido a la difícil implementación de estos últimos en los centros hospitalarios, son los métodos fenotípicos convencionales, acompañados de los morfológicos y fisiológicos los que juegan un papel crítico en el trabajo de rutina diario del laboratorio de microbiología (2).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para conocer el alcance, sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos automatizados disponibles. Pero, en su mayoría, los trabajos realizados sobre este particular no utilizaron métodos fenotípicos convencionales para establecer comparacio-

nes y evaluar los resultados de los métodos automatizados (4, 6, 14-28). Debido a lo anteriormente expuesto, se realizó una investigación en la cual se comparó la identificación de levaduras de interés clínico por dos métodos automatizados disponibles en Venezuela, con la identificación por los métodos fenotípicos convencionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio de corte transversal, aleatorio, a ciegas, comparativo y experimental para evaluar la identificación de levaduras por los métodos automatizados Vitek YBC® y MicroScan Walk Away RYID® con los métodos fenotípicos convencionales, que fueron considerados como métodos de referencia o patrón oro en este trabajo.

### Microorganismos

Se utilizaron 193 aislamientos de levaduras provenientes de la colección de cultivos del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) y de muestras clínicas aisladas en el laboratorio de Microbiología del Centro Médico Loira, en Caracas, Venezuela, durante el año 2007. Se incluyeron además 5 cepas de referencia derivadas de la American Type Culture Collection (ATCC) pertenecientes a la colección de cultivos del Departamento de Micología del INHRR: *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 200956 y *Candida krusei* ATCC 6258. Todas las levaduras fueron preservadas en agua destilada estéril (29) hasta su identificación posterior por los métodos fenotípicos convencionales y automatizados.

Cada levadura fue identificada por los métodos fenotípicos de Huppert (asimilación de carbohidratos) (15,16), visualización de la morfología microscópica en agar harina de maíz (Corn Meal Agar, CMA), re-

sistencia a la cicloheximida (5, 9, 10) y el uso de agar cromogénico (Oxoid). La identificación automatizada se realizó mediante el uso de los equipos Vitek® y Walk Away®. A las levaduras que fueron identificadas como *Candida albicans* le fueron practicadas las pruebas complementarias de tubo germinal y producción de clamidoconidias. Adicionalmente, se realizó la prueba de ureasa a las levaduras identificadas como *Cryptococcus* spp. y para diferenciar entre sí a los géneros *Trichosporon* y *Geotrichum* (1, 5).

### Interpretación de los resultados de los sistemas automatizados Vitek YBC®, Microscan Walk Away RYID®

Los resultados de ambos sistemas se basan en niveles de probabilidad. Cuando la probabilidad de identificación fue igual o mayor al 85% se consideró una identificación correcta (IC). Cuando la probabilidad de identificación fue menor del 85% se consideró una identificación incorrecta (II). Ante estos incidentes, los equipos emiten los siguientes mensajes: no discrimina entre ambas identificaciones, buena concordancia difícil diferenciación, patrón bioquímico dudoso, baja probabilidad de identificación y no identificado; en casi todos ellos los equipos muestran las pruebas adicionales necesarias y su probabilidad de positividad en porcentaje, para discriminar entre los posibles géneros y especies sugeridos. Cuando se presentaron estos casos, se realizó nuevamente la identificación de la levadura con II y se tomó en cuenta el segundo resultado de identificación.

### Análisis estadístico

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa EPI INFO versión 3.5.3 para estudios descriptivos. La evaluación estadística de los resultados fue realizada utilizando tablas de contingencia de 2×2 y la prueba de Chi cuadrado de Mc Nemar ( $\chi^2$ )

(30), para evaluar si las variables del estudio se relacionaban entre sí. Se tomó un valor de  $p \leq 0,05$  como significativo, usando un error  $\alpha=0,05$  y un 95% de confianza estadística. El porcentaje de concordancia de los sistemas automatizados se calculó como la razón entre la frecuencia de IC de levaduras por los sistemas Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® y la frecuencia de IC de los métodos fenotípicos convencionales por 100. El índice Kappa se usó para calcular la concordancia entre la identificación de las levaduras por la metodología automatizada versus la identificación por los métodos fenotípicos convencionales, según sus distintos niveles: 0=pobre; 0,01-0,20=leve; 0,21-0,40=aceptable; 0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=considerable; 0,81-1,00=casi perfecta (30, 31). Se calcularon los errores mayores (EM) y errores menores (Em) para las metodologías automatizadas. Los EM fueron aquellos donde se identificó correctamente la levadura por los métodos fenotípicos convencionales y los métodos automatizados identificaron de forma incorrecta la levadura con un nivel de confianza igual o mayor al 85%. Los Em fueron aquellos donde se identificó la levadura correctamente por los métodos fenotípicos convencionales y los métodos automatizados realizaron una identificación con un nivel de confianza menor al 85%. Por último se calculó la potencia de cada método de identificación, que resulta de la división de la proporción de IC de los métodos fenotípicos convencionales entre la proporción de IC de los métodos automatizados. Si el resultado es igual a 1 los métodos comparados poseen igual potencia para la identificación de levaduras. Si el resultado es mayor que 1 significa que los métodos fenotípicos convencionales son más potentes que los métodos automatizados para la identificación de levaduras.

## RESULTADOS

Se identificaron 198 levaduras por los métodos fenotípicos convencionales y las metodologías automatizadas, las cuales fueron divididas en dos grupos: 1) levaduras de aislamiento frecuente y 2) levaduras de aislamiento poco frecuente. El total de levaduras del grupo 1 fue 178 (90%), correspondiendo a 68 Complejo *C. albicans* (38,2%), 44 *C. tropicalis* (24,7%), 28 Complejo *C. parapsilosis* (15,7%), 20 Complejo *C. glabrata* (11,2%), 12 Complejo *C. krusei* (6,7%), 4 Complejo *Trichosporon* spp. (2,2%) y 2 Complejo *Cryptococcus neoformans* (1,1%). Las levaduras del grupo 2 fueron 20 (10%), correspondiendo a 6 *C. lusitanae* (30%), 3 *Wickerhamomyces anomalous* (*Pichia anomala* - *Hansenula anomala*) (15%), 2 *C. lipolytica* (10%) y un aislamiento (5%) de cada uno de los siguientes géneros y especies: *C. famata*, *C. kefir*, *C. pelliculosa*, Complejo *C. guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *C. unigutulatus*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. rubra*).

En la Tabla I se muestran los resultados de concordancia, índice Kappa, EM, Em y potencia de los métodos fenotípicos convencionales al compararlos con los métodos automatizados, estratificándolos primero para todas las levaduras y seguidamente para los grupos 1 y 2. El sistema Vitek® es más robusto que el sistema MicroScan Walk Away RYID® para la identificación de levaduras según los resultados obtenidos en este estudio. Se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) al comparar la identificación de levaduras entre las metodologías automatizadas y los métodos fenotípicos convencionales para todas las levaduras usadas en el estudio, así como con las levaduras del grupo 1; por lo tanto, los métodos comparados son concordantes entre sí. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre

**TABLA I**  
 CONCORDANCIA, ERRORES Y POTENCIA DE LOS MÉTODOS AUTOMATIZADOS VITEK® YBC Y MICROSCAN WALK AWAY® RYID PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN COMPARACIÓN CON EL MÉTODO FENOTÍPICO CONVENCIONAL

Levaduras	Método	C (%)	IK	Errores N (%)		P
				EM	Em	
Todas las levaduras (n=198)	Vitek®	88,4	0,77	14 (7,1)	9 (4,5)	1,14
	MicroScan®	85,9	0,72	22 (11,1)	6 (3,0)	1,17
Levaduras de aislamiento frecuente (n=178)	Vitek®	89,8	0,80	9 (5,1)	9 (5,1)	1,11
	MicroScan®	90,4	0,80	11 (6,2)	6 (3,4)	1,11
Levaduras de aislamiento poco frecuente (n=20)	Vitek®	75,0	0,50	5 (25)	0	1,33
	MicroScan®	45,0	-0,2	11 (55)	0	2,2

C: Concordancia de los métodos automatizados en comparación con el método fenotípico convencional. IK: Índice kappa para la concordancia. EM: errores mayores. Em: errores menores. P: Potencia del método fenotípico convencional al compararlo con el método automatizado.

ambas metodologías automatizadas ( $p > 0,05$ ), al comparar la identificación de levaduras del grupo 2 con los métodos fenotípicos convencionales. El índice Kappa también indicó que los métodos automatizados no son concordantes con los métodos convencionales para la identificación de este grupo.

En la Tabla II se muestran los resultados generales obtenidos de IC e II de las levaduras ensayadas según los métodos de identificación utilizados. El sistema Vitek® identificó correctamente el 88,4% del total de levaduras e identificó de forma incorrecta 11,6%. El sistema Microscan Walk Away® identificó correctamente 85,9% del total de levaduras e identificó incorrectamente un 14,1% de los casos. El porcentaje de II para el grupo 1 fue de 10,2 y 9,6% con los sistemas Vitek® y Microscan Walk Away®, respectivamente; para el grupo 2 fue de 25% con el sistema Vitek® y 55% con Microscan Walk Away®.

En la Tabla III se muestra la variedad de resultados obtenidos de las II realizadas por los métodos automatizados. Se pudo observar que ambos sistemas presentaron problemas de identificación con levaduras

de aislamiento frecuente como *C. tropicalis* y los Complejos *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Igualmente, ambos equipos generaron II para levaduras de aislamiento poco frecuente como *W. anomalous*, *C. kefyr* y *C. unigutulatus*, entre otras. En la mayoría de los casos los equipos sugirieron dos y hasta tres posibles taxones como probable identificación para la levadura.

## DISCUSIÓN

Según los resultados de este estudio, los sistemas automatizados Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® pueden ser utilizados para la identificación de levaduras de importancia clínica, especialmente para las de aislamiento frecuente (grupo 1), pero se debe tener precaución ante la identificación de levaduras de aislamiento poco frecuente (grupo 2).

Existen escasos estudios en la literatura donde se comparan los métodos automatizados de identificación con los métodos fenotípicos convencionales, por lo que es muy difícil contrastar los resultados obtenidos en esta investigación con los de otros investigadores. La mayoría de los trabajos

**TABLA II**  
 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR LOS MÉTODOS AUTOMATIZADOS  
 VITEK YBC® Y MICROSCAN WALK AWAY® RYID

Grupo	Género y especie	N	Método	N (%)	
				IC	II
Grupo 1 Levaduras de aislamiento frecuente	<i>Candida albicans</i>	68	Referencia	68(100)	0
			Vitek YBC®	68(100)	0
			MicroScan RYID®	67(98,5)	1(1,5)
	<i>Candida tropicalis</i>	44	Referencia	44(100)	0
			Vitek YBC®	34(77,3)	10(22,7)
			MicroScan RYID®	42(95,5)	2(4,5)
	Complejo <i>Candida krusei</i>	12	Referencia	12(100)	0
			Vitek YBC®	7(58,3)	5(41,7)
			MicroScan RYID®	7(58,3)	5(41,7)
	Complejo <i>Candida parapsilosis</i>	28	Referencia	28(100)	0
			Vitek YBC®	25(89,3)	3(10,7)
			MicroScan RYID®	22(78,5)	6(21,5)
	Complejo <i>Candida glabrata</i>	20	Referencia	20(100)	0
			Vitek YBC®	20(100)	0
			MicroScan RYID®	17(85)	3(15)
	Complejo <i>Trichosporon spp.</i>	4	Referencia	4(100)	0
Vitek YBC®			4(100)	0	
MicroScan®RYID			4(100)	0	
Complejo <i>Cryptococcus neoformans</i>	2	Referencia	2(100)	0	
		Vitek YBC®	2(100)	0	
		MicroScan RYID®	2(100)	0	
Grupo 2 Levaduras de aislamiento poco frecuente	<i>Candida lusitanae</i>	6	Referencia	6(100)	0
			Vitek YBC®	6(100)	0
			MicroScan RYID®	4(66,7)	2(33,3)
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	3	Referencia	3(100)	0
			Vitek YBC®	0	3(100)
			MicroScan RYID®	1(33,3)	2(66,7)
<i>Candida lipolytica</i>	2	Referencia	2(100)	0	
		Vitek YBC®	2(100)	0	
		MicroScan RYID®	0	2(100)	

TABLA II (Continuación)

Grupo	Género y especie	N	Método	N (%)	
				IC	II
Grupo 2 Levaduras de aislamiento poco frecuente	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	1(100)	0
			MicroScan RYID®	1(100)	0
	<i>Geotrichum candidum</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	1(100)	0
			MicroScan RYID®	0	1(100)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	1(100)	0
			MicroScan RYID®	1(100)	0
	<i>Cryptococcus unigutulatus</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	0	1(100)
			MicroScan RYID®	0	1(100)
	<i>Candida famata</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	1(100)	0
			MicroScan RYID®	0	1(100)
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	1(100)	0
			MicroScan RYID®	1(100)	0
	<i>Candida kefyr</i>	1	Referencia	1(100)	0
			Vitek YBC®	0	1(100)
MicroScan RYID®			0	1(100)	
<i>Candida pelliculosa</i>	1	Referencia	1(100)	0	
		Vitek YBC®	1(100)	0	
		MicroScan RYID®	1(100)	0	
Complejo <i>Candida guilliermondii</i>	1	Referencia	1(100)	0	
		Vitek YBC®	1(100)	0	
		MicroScan RYID®	0	1(100)	

N: número de levaduras ensayadas; IC: identificación correcta; II: identificación incorrecta.

revisados para documentar esta investigación utilizaron el sistema API 20C AUX® (bioMérieux) o métodos moleculares como “patrón oro” (18-22, 24-28). Es importante señalar que el sistema API 20C AUX® fue

diseñado a partir del método fenotípico convencional de asimilación de azúcares (considerado el patrón oro en su momento), y no se debe olvidar que, al ser un método de distribución comercial, no debe ser

**TABLA III**  
IDENTIFICACIONES INCORRECTAS REALIZADAS POR LOS MÉTODOS AUTOMATIZADOS VITEK YBC® Y MICROSCAN WALK AWAY RYID®

Método	N (%)	Género y especies (N)	Identificación incorrecta (N)
Vitek YBC®	23 (11,6)	<i>Candida tropicalis</i> (10)	<i>Candida guilliermondii</i> o <i>Candida tropicalis</i> <sup>1</sup> (2) <i>Candida tropicalis</i> o <i>Candida lusitaniae</i> <sup>2</sup> (8)
		Complejo <i>Candida krusei</i> (5)	<i>Yarrowia lipolytica</i> (2) <i>Trichosporon beigeli</i> (1) No identificado (2)
		Complejo <i>Candida parapsilosis</i> (3)	<i>Candida guilliermondii</i> o <i>Candida parapsilosis</i> <sup>1</sup> (2) <i>Candida parapsilosis</i> o <i>Trichosporon pullulans</i> <sup>3</sup> (1)
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (3)	No identificado (2) <i>Trichosporon pullulans</i> (1)
		<i>Cryptococcus unigutulatus</i> (1)	<i>Cryptococcus humicola</i> o <i>Trichosporon beigeli</i> <sup>1</sup> (1)
		<i>Candida kefyr</i> (1)	<i>Geotrichum candidum</i> o <i>Prototheca zopfii</i> <sup>1</sup> (1)
		<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Candida albicans</i> o <i>Candida catenulata</i> <sup>4</sup> (1)
		<i>Candida tropicalis</i> (2)	<i>Candida guilliermondii</i> (1) <i>Geotrichum</i> spp. o <i>Candida guilliermondii</i> <sup>1</sup> (1)
		Complejo <i>Candida krusei</i> (5)	<i>Hansenula polymorpha</i> (2) <i>Hansenula polymorpha</i> o <i>Cryptococcus laurentii</i> <sup>1</sup> (1) <i>Candida krusei</i> o <i>Saccharomyces cerevisiae</i> o <i>Candida tropicalis</i> <sup>3</sup> (1) <i>Candida krusei</i> o <i>Candida glabrata</i> <sup>3</sup> (1)
		Complejo <i>Candida parapsilosis</i> (6)	<i>Prototheca wickerhamii</i> o <i>Candida parapsilosis</i> <sup>1</sup> (1) <i>Prototheca wickerhamii</i> o <i>Candida zeylanoides</i> o <i>Candida parapsilosis</i> <sup>3</sup> (2) <i>Hansenula anomala</i> (2) <i>Candida parapsilosis</i> o <i>Candida albicans</i> <sup>3</sup> (1)
MicroScan Walk Away RYID®	28 (14,1)	Complejo <i>Candida glabrata</i> (3)	<i>Candida famata</i> (1) <i>Prothoteca</i> spp. o <i>Candida zeylanoides</i> o <i>Candida catenulata</i> <sup>3</sup> (1) <i>Candida glabrata</i> o <i>Candida krusei</i> <sup>3</sup> (1)
		<i>Candida lusitaniae</i> (2)	<i>Candida famata</i> (2)
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (2)	<i>Candida lusitaniae</i> (1) <i>Candida albicans</i> (1)
		<i>Candida lipolytica</i> (2)	<i>Candida albicans</i> (1) <i>Candida albicans</i> o <i>Candida rugosa</i> <sup>1</sup> (1)
		<i>Geotrichum candidum</i> (1)	<i>Candida tropicalis</i> (1)
		<i>Cryptococcus unigutulatus</i> (1)	<i>Cryptococcus albidus</i> (1)
		<i>Candida famata</i> (1)	<i>Candida lusitaniae</i> o <i>Candida guilliermondii</i> <sup>1</sup> (1)
		<i>Candida kefyr</i> (1)	<i>Candida krusei</i> (1)
		Complejo <i>Candida guilliermondii</i> (1)	<i>Candida albicans</i> o <i>Candida guilliermondii</i> <sup>1</sup> (1)

N: número de levaduras ensayadas; <sup>1</sup>No discrimina entre ambas identificaciones; <sup>2</sup>Buena concordancia difícil diferenciación; <sup>3</sup>Patron bioquímico dudoso; <sup>4</sup>Baja probabilidad de identificación.

usado como método de referencia, ya que se puede incurrir en un alto riesgo de errores (2). Estudios realizados con este sistema para la identificación de levaduras avalan esta afirmación. En el trabajo realizado por Schuffenecker y col. (28), el sistema API identificó correctamente el 86,5% de levaduras provenientes de aislamientos clínicos. Ramani y col. (25) informaron que el API 20C identificó 97% de levaduras de aislamiento frecuente y 88% de aislamiento poco frecuente o raras. Land y col. (26) demostraron que el API 20C usado como único sistema de identificación sólo identificó el 75% de las levaduras. Por otra parte, Latouche y col. (22) al comparar el sistema Vitek YBC® y el ID 32C con la técnica de huella dactilar y reacción en cadena de la polimerasa (PCR *fingerprinting*), reportaron 87,3 y 76,8% de identificaciones correctas para levaduras provenientes de aislamientos clínicos respectivamente, siempre que las especies probadas estuvieran incluidas en la base de datos de estos sistemas; cuando se evaluaron especies poco frecuentes no incluidas en las bases de datos, los porcentajes de identificación disminuyeron a 76,5 and 77,5% respectivamente.

En cuanto al MicroScan Walk Away RYID®, no se encontró literatura que comparara a este método con los fenotípicos convencionales. Algunos estudios han informado que la identificación de levaduras de aislamiento clínico por este sistema se encuentra en el rango de 82 al 96% (17, 18, 20), comparándolo con el API 20C AUX® (bioMérieux) como “método de referencia”. Riddle y col. (18) encontraron que para los sistemas Vitek YBC® y MicroScan Walk Away RYID® los porcentajes de identificación correcta aumentaban de 85 a 95% y de 67 a 92% respectivamente, cuando se realizaba una segunda identificación a las levaduras que no resultaban identificadas inicialmente por estos equipos.

Ambos sistemas presentaron problemas de identificación tanto con levaduras de aislamiento frecuente como *C. tropicalis* y los Complejos *C. albicans* *C. krusei* y *C. parapsilosis*, como con levaduras de aislamiento poco frecuente, como *W. anomalus*, *C. kefyr* y *C. unigutulatus* entre otras, resultados que coinciden con los de otras investigaciones (17-20, 22, 27). Estos resultados apoyan la necesidad de que el operador no debe conformarse sólo con el resultado emitido por el equipo automatizado sino que debe utilizar pruebas fenotípicas complementarias conjuntamente con la identificación realizada por estos sistemas. La revisión de Pincus y col. (2) y los trabajos de St-Germain y col. (17) y Latouche y col. (22) sustentan esta afirmación, ya que encontraron que el porcentaje de identificación de levaduras de aislamiento clínico aumentaba cuando se incluía junto con la identificación automatizada la visualización de la morfología microscópica usando CMA, recomendando su uso en paralelo a la utilización de los sistemas automatizados. Otra sugerencia importante para solucionar este problema es incluir el uso de medios de cultivo cromogénicos, los cuales son capaces de identificar presuntivamente 3 especies del género *Candida*, discriminando además la pureza del aislamiento (2, 5, 17, 22).

La presencia de EM y Em de identificación en ambos equipos indica que estos son capaces de realizar identificaciones incorrectas con un nivel de confianza igual o superior al 85% e identificaciones que probablemente sean correctas pero con porcentajes por debajo del 85%, respectivamente. Ante estas situaciones, los programas de estos equipos junto a las bases de datos sugieren otras alternativas de identificación, ya sea otro género o la realización de pruebas complementarias. Por lo tanto, el operador de estos equipos debe utilizar su criterio microbiológico, las pruebas complementarias sugeridas por el equipo (si están dispo-

nibles en el laboratorio) y los métodos fenotípicos convencionales recomendados en el párrafo anterior, a fin de emitir un resultado de identificación confiable.

El microbiólogo que opera estos sistemas también debe ser capaz de resolver otras situaciones. Algunas levaduras, incluso de aislamiento frecuente, poseen dos fases reproductivas: asexual (anamorfa) y sexual (teleomorfa) (1, 3, 5, 32-34). Las bases de datos de los sistemas automatizados han sido elaboradas en base al Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB), en el cual, aunque la levadura posea ambas fases de reproducción, se utiliza el nombre correspondiente a la fase sexual, por lo tanto, ese será el reflejado al momento de la identificación. Desde el punto de vista clínico el nombre de la fase asexual es más conocido que el de la fase sexual: un ejemplo es *C. krusei* (anamorfo) y *Pichia kudriavzevii*, conocida anteriormente como *Issatchenkia orientalis* (ambos nombres aplican para el estado teleomorfo); es la misma levadura con dos o tres nombres, correspondientes a sus morfotipos (35). Informar la identificación de una levadura ampliamente conocida por su nombre teleomórfico genera problemas de interpretación para el médico, además de desconcierto por las implicaciones que pueda tener desde el punto de vista terapéutico. El microbiólogo que tiene conocimiento de esta problemática generará menos consultas al laboratorio de microbiología si informa el nombre de la fase anamorfa (32). Otro ejemplo es el de *W. anomalus*, conocida anteriormente como *P. anomala* y *H. anomala*; los tres nombres corresponden a la fase sexual de *C. pelliculosa* (35, 36); los dos sistemas automatizados tuvieron problemas para identificarla; solamente el sistema MicroScan Walk Away RYID® logró hacerlo una vez de forma correcta identificándola como *H. anomala*, que es el taxón incluido en la base de datos.

Afortunadamente, iniciativas a nivel mundial, están avocadas a resolver el problema generado por el CINB, proponiendo el uso de un solo nombre para cada hongo y la creación de un nuevo código más práctico, que acomode taxonómicamente a los hongos microscópicos y elimine la doble nomenclatura. A partir del 1 de enero de 2013 cada hongo tendrá un solo nombre y se debe poner en práctica este importante cambio; en los casos en que un nombre teleomórfico no se use ampliamente, simplemente se utilizará el nombre anamórfico (33, 34).

Existen otros aspectos importantes a considerar. La taxonomía de las levaduras ha sufrido grandes cambios, gracias a los avances de la biología molecular; la rapidez con la que se han generado impide que las bases de datos de los equipos automatizados se mantengan actualizadas. Un ejemplo de ello es el Complejo *C. albicans* sensu lato [formado por *C. albicans* sensu stricto (que incluye *C. stellatoidea* y *C. africana*) y *C. dubliniensis*]; todas son fenotípicamente similares entre sí pero genéticamente diferentes. Los sistemas de identificación automatizada evaluados en este trabajo no son capaces de diferenciar entre estas especies. Sin embargo, con los métodos fenotípicos convencionales se puede realizar una identificación presuntiva de *C. dubliniensis* (37-39). Independientemente del uso de estas pruebas, si la levadura identificada como *C. dubliniensis* no es confirmada por métodos moleculares, el reporte de identificación del laboratorio debe ser Complejo *C. albicans*.

Hay otras levaduras que actualmente también forman complejos de especies, entre ellas: Complejo *C. parapsilosis* sensu lato (incluye *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*); Complejo *C. krusei* sensu lato (formado por *C. krusei*, *C. inconspicua* y *C. norvegensis*); Complejo *C. glabrata* sensu lato (constituido por

*C. glabrata*, *C. bracariensis* y *C. nivariensis*); Complejo *C. guilliermondii* sensu lato (incluye a *C. guilliermondii*, *C. fermentati* y *C. carpophila*) (35, 36, 40-42); Complejo *C. neoformans* (formado por *C. neoformans* y *C. gattii*). Para poder diferenciar entre las especies de cada uno de estos complejos se requieren pruebas moleculares, ya que fenotípicamente son indistinguibles, con la excepción del Complejo *C. neoformans* (35, 36). En los casos que se identifiquen las especies del género *Candida* nombradas anteriormente, el reporte del laboratorio debe emitirse utilizando la palabra "Complejo", independientemente de los métodos utilizados. Para separar las especies del Complejo *C. neoformans* se necesitan pruebas fenotípicas adicionales que no están disponibles en los sistemas automatizados, como el uso del agar glicina-canavanina-azul de bromotimol (35, 36, 43); si el laboratorio no lo posee, el reporte debe ser Complejo *C. neoformans*.

La identificación de levaduras de interés clínico se ha convertido en una rutina dentro del laboratorio y contribuye al manejo clínico y terapéutico adecuado de los pacientes con enfermedades fúngicas invasoras. Los sistemas automatizados de identificación han tenido un gran impacto en el laboratorio de microbiología, debido a que mejoran considerablemente el manejo de grandes volúmenes de microorganismos para la identificación, lo que permite a su vez proporcionar un diagnóstico precoz. Pero, la ausencia de adecuados estudios comparativos que evalúen estos sistemas, no ha permitido determinar de forma objetiva cuál es el mejor sistema comercial.

Sin embargo, el laboratorio debe estar preparado para asumir el reto de realizar la identificación de levaduras apropiada y eficazmente. Los métodos automatizados evaluados en este estudio tienen niveles de concordancia aceptables al compararlos con los métodos fenotípicos convenciona-

les, pero presentan EM y Em que pueden causar que el operador de estos equipos emita un resultado incorrecto si no está preparado para resolver los problemas que puedan presentarse. El sistema Vitek® es más robusto que el sistema MicroScan Walk Away RYID® para la identificación de levaduras, sin embargo, deben utilizarse pruebas fenotípicas adicionales que complementen la identificación, tales como el uso de medios de cultivo cromogénicos y la visualización de la morfología microscópica de la levadura en el medio de CMA utilizando el método de Dalmau, independientemente que las levaduras sean de aislamiento frecuente o infrecuente.

Finalmente, los métodos automatizados representan una herramienta valiosa para el diagnóstico de levaduras, sin embargo, la experiencia del microbiólogo continúa siendo una fortaleza importante para asegurar la calidad de los resultados.

## REFERENCIAS

1. Hazen C, Howell S. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Murray P, et al Eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. Washington DC: ASM Press; 2007. pp 1762-1788.
2. Pincus DH, Orenge S, Chatellier S. Yeast identification-past, present, and future methods. Med Mycol 2007; 45:97-121.
3. Barnett JA, Payne R, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Third edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
4. Panizo MM, Reviakina V, Dolande M, Maldonado B. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (1996-2001). Rev Soc Ven Microbiol 2002; 22:57-63.
5. Dolande M, Reviakina V, Panizo MM. Manual de identificación y pruebas de susceptibilidad de levaduras a los antifúngicos. Caracas: Pfizer de Venezuela; 2008.

6. **Bukonja AM, Maldonado B, Reviakina V, Dolande M.** Estudio comparativo entre el sistema ID 32C y el método convencional para la identificación de levaduras de interés clínico. *Rev Soc Ven Microbiol* 1997; 17:65-66.
7. **Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M.** Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3793-3795.
8. **Wickerham L, Burton K.** Carbon assimilation test for the classification of yeast. *J Bacteriol* 1948; 56: 363-371.
9. **Huppert M, Harper G, Sun S, Delanerolle V.** Rapid methods for identification of yeast. *J Clin Microbiol* 1975; 2:21-34.
10. **Moore K, Johnson M, McClary S.** Disk inoculum-solid medium method to test carbon and nitrogen assimilation by yeast isolates. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:3185-3186.
11. **Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH.** Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis* 2014; 20:329-344.
12. **Paulo C, Mourao C, Viega PM, Marques JM, Rocha G, Alves AF, Querola, Melico-Silvestre AA, Goncalves, Flores O, Clemente C, Goncalves T.** Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med Mycol* 2009; 47:836-844.
13. **Cendejas-Bueno E, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.** Identification of pathogenic rare yeasts in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1895-1899.
14. **López C, Giro L, Ramos S, Ramadán L, Bulacio L.** Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies de género *Candida*. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37:16-21.
15. **Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH.** 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; 44:227-228.
16. **Meurman O, Koskensalo A, Rantakokko-Jalava K.** Evaluation of Vitek 2 for identification of yeast in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:591-593.
17. **St-Germain G, Beauchesne D.** Evaluation of the MicroScan rapid yeast identification panel. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2296-2299.
18. **Riddle D, Giger O, Miller L, Hall G, Woods G.** Clinical comparison of the Baxter MicroScan yeast identification panel and the Vitek yeast biochemical card. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:438-442.
19. **Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I.** Comparison of three commercial systems for identification of yeast commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1967-1970.
20. **Dooley DP, Beckius M, Jeffrey BS.** Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek yeast biochemical card. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2889-2892.
21. **Huang Lu, Chen CH, Chou CF, Lu JJ, Chi WM, Lee WH.** A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar *Candida*, Vitek System YBC and a traditional method. *Chin Med J* 2001; 64:568-574.
22. **Latouche N, Daniel HM, Lee OC, Mitchell T, Sorrel T, Meyer W.** Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3171-3180.
23. **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; 45:1343-1346.
24. **Guelfand L, Grisolia P, Bozzano C, Kauffman S.** Comparison of methods for the identification of the most common

- yeasts in the clinical microbiology laboratory. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35:49-53.
25. **Ramani R, Gromadzki S, Pincus D, Salkin I, Chaturvedi V.** Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3396-3398.
  26. **Land G, Harrison B, Hulme K, Cooper B, Byrd J.** Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *J Clin Microbiol* 1979; 10:357-364.
  27. **Deak T, Beauchat LR.** Evaluation of the MicroSacn enzyme-based system for the identification of foodborne yeasts. *J Appl Bacteriol* 1995; 79:439-446.
  28. **Schuffenecker I, Freydere A, de Montclos H, Gille Y.** Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:255-260.
  29. **Panizo MM, Reviakina V, Montes W, González G.** Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25:35-40.
  30. **Ilstrup D.** Statistical methods in microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:219-226.
  31. **Bautista G, Tamayo MC.** Evaluación de pruebas diagnósticas. *Estudios de concordancia. Revista Científica* 2005; 11:74-79.
  32. **Hazen KC.** New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:462-478.
  33. **Taylor JW.** One Fungus=One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2011; 2:113-120.
  34. **Hawksworth DL.** A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2011; 2:155-162.
  35. **De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** *Atlas of Clinical Fungi*. 3rd ed. (CD only). Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2011.
  36. **Larone, DH.** *Medically important fungi. A guide to identification*. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2011.
  37. **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.
  38. **Fenn J.** Update of medically important yeasts and a practical approach to their identification. *Lab Medicine* 2007; 38: 178-183.
  39. **Freydiere AM, Guinet R, Boiron P.** Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39:9-33.
  40. **Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC.** *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43:284-292.
  41. **Boekhout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G.** Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. *Curr Fungal Infect Rep* 2009; 3:170-178.
  42. **Guarro J.** Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 33-39.
  43. **Bovers M, Hagen F, Boekhout T.** Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:S4-S12.