

Análisis de concordancia de diferentes metodologías para la identificación de aislamientos orales de especies de *Candida* en Colombia

Alejandra Zuluaga^{1*}, Karen Arango^{1*}, Diego H. Caceres², Zilpa A. Sánchez-Quitian³, Verónica Velásquez¹, Beatriz L. Gómez^{1,4}, Claudia M. Parra-Giraldo³, Natalia Maldonado⁵, Luz E. Cano^{1,6}, Catalina de Bedout¹, Raúl Rivera⁷

1. Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia. 2. ORISE Fellow with the Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. 3. Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 4. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia. 5. Laboratorio Médico de Referencia S.A.S, Grupo GERMEN, Medellín, Colombia. 6. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 7. Universidad Antonio Nariño, Armenia – Quindío, Colombia

*Estas autoras contribuyeron de igual forma en este trabajo.
Contacto: zuluaga.alejandra@gmail.com

INTRODUCCIÓN

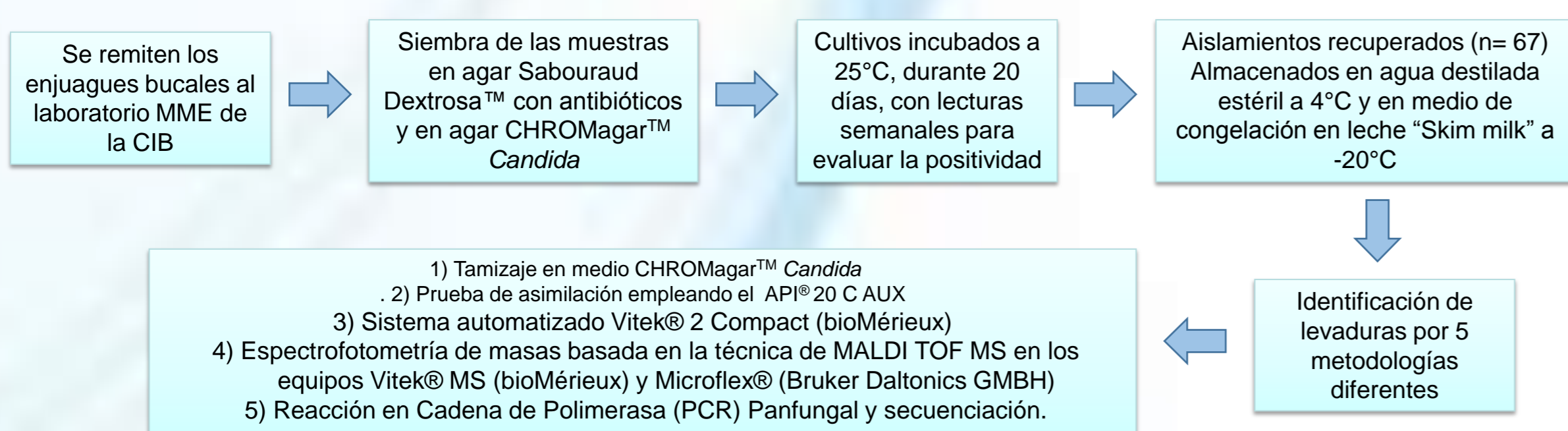
La correcta identificación de levaduras del género *Candida* es uno de los retos más grandes existentes en la actualidad, en especial, porque esto retrasa la instauración de un adecuado tratamiento en el paciente (1). Actualmente, existen diversas metodologías para la identificación de levaduras, algunas basadas en medios cromogénicos como el CHROMagarTM *Candida* que permiten tener una identificación presuntiva de una manera rápida, también existen sistemas comerciales como el API[®] 20 C AUX o el sistema Vitek[®] 2 Compact los cuales están basados en pruebas bioquímicas (2); otra metodología es la espectrometría de masas que ha surgido como un método valioso para la identificación de levaduras en el laboratorio de microbiología por su rapidez, precisión y bajo costo (3,4); y por último, tenemos las técnicas moleculares basadas en la secuenciación de ácidos nucleicos que proporcionan una identificación más precisa y que, a su vez, permiten identificar especies (5).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concordancia entre cinco diferentes métodos, tanto convencionales como moleculares y de espectrometría de masas, empleados para la identificación de levaduras del género *Candida*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Aislamientos e identificación de levaduras



- Diseño metodológico y análisis estadístico

Los diferentes métodos para la identificación de levaduras evaluados fueron comparados mediante un análisis de concordancia, con el cálculo del índice de Kappa ponderado (Kp) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

Un análisis de costos comerciales y tiempo de procesamiento de muestras por cada método fue realizado mediante el análisis gráfico de ambas variables.

La interpretación se realizó mediante el análisis gráfico de las dos variables (costos y tiempo). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico STATA8.0[®] y los gráficos mediante el Software Microsoft Excel 2010[®].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

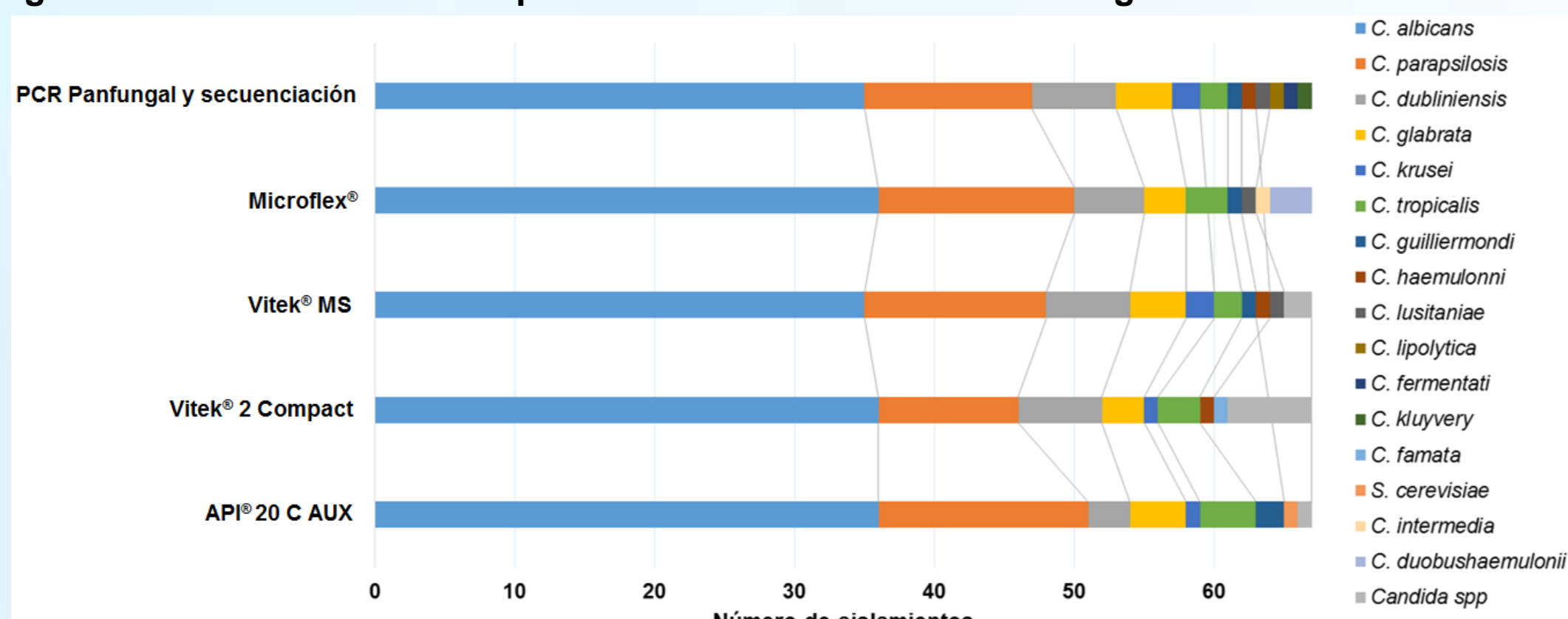
Tabla1. Método de tamizaje CHROMagarTM *Candida*[®]

Métodos Comparados	Kappa Ponderado (IC 95%)
CHROMagar TM <i>Candida</i> vs API [®] 20 C AUX	1,00 (1,00 – 1,00)
CHROMagar TM <i>Candida</i> vs Vitek [®] 2 Compact	0,87 (0,75 – 0,96)
CHROMagar TM <i>Candida</i> vs Vitek [®] MS	0,92 (0,80 – 0,99)
CHROMagar TM <i>Candida</i> vs Microflex [®]	0,97 (0,94 – 1,00)
CHROMagar TM <i>Candida</i> vs PCR Panfungal y secuenciación	0,98 (0,95 – 1,00).

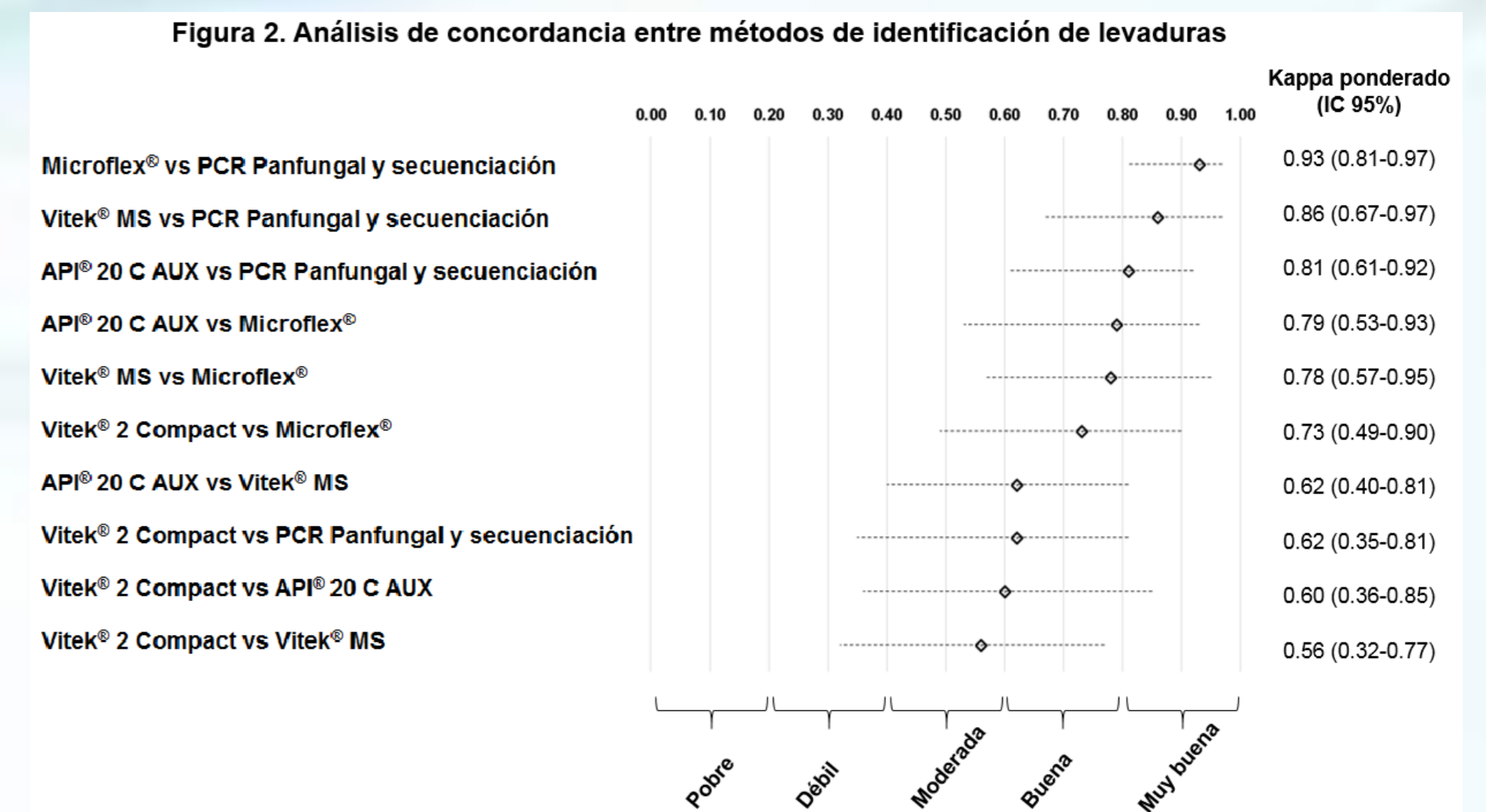
Los resultados del Kappa ponderado para el método de tamizaje (Kp) oscilaron entre 0,87 y 1,00 (categoría muy buena).

El método Vitek[®] 2 Compact fue el que presentó una menor concordancia y la mayor concordancia fue observada con el método API[®] 20 C AUX.

Figura 1. Distribución de las especies de levaduras clasificadas según el método de identificación



La PCR Panfungal y secuenciación, fue el método que logró diferenciar un mayor número de especies (n=12), donde tres no fueron identificadas por ninguna otra metodología.



Los sistemas API[®] 20 C AUX y Vitek[®] 2 Compact fueron los que presentaron menor capacidad para diferenciar especies del género *Candida* y presentaron menores valores de Kp.

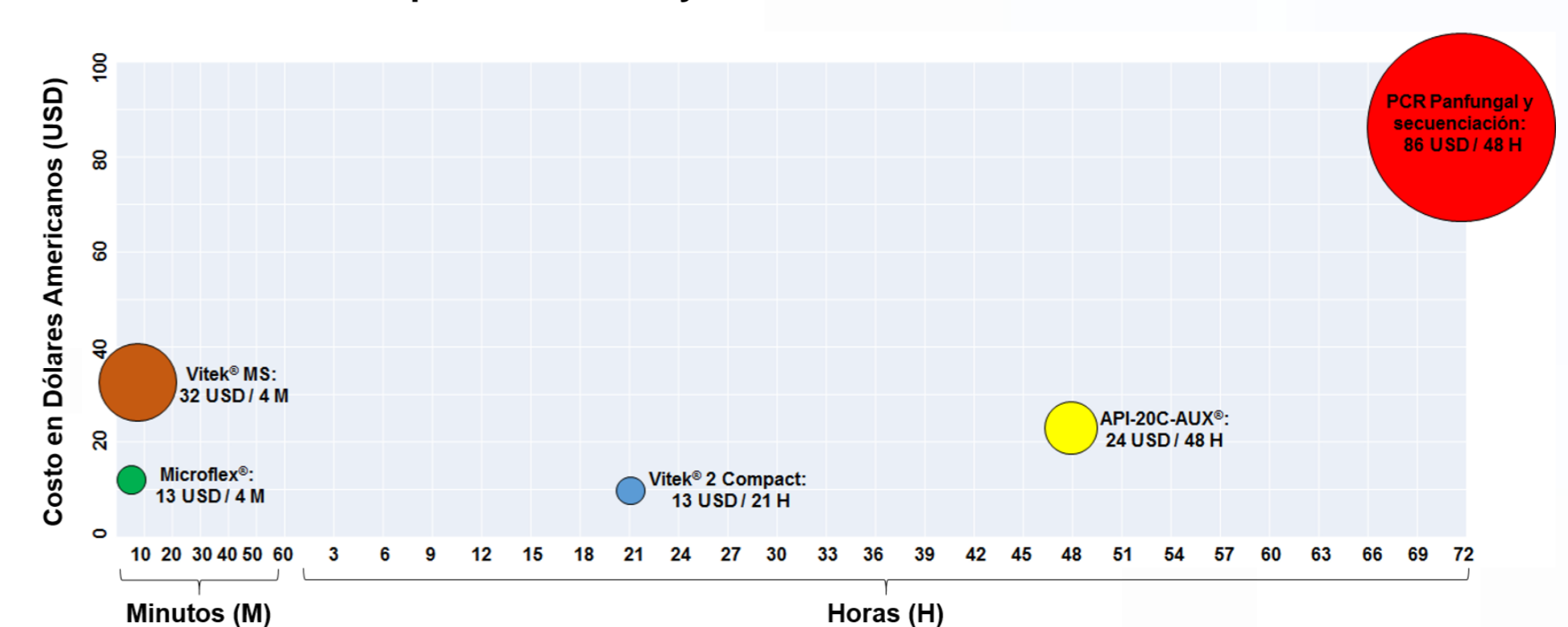
Las metodologías basadas en MALDI TOF (Microflex[®] y Vitek[®] MS) presentaron una alta concordancia comparadas con el método de referencia (PCR Panfungal y secuenciación). Ambas plataformas fueron capaces de identificar el mismo número de especies (n=9), mostrando una concordancia muy buena (Kp >0,8).

Tabla 2. Comparación de concordancias y discordancias de los métodos API[®] 20 C AUX, Vitek[®] 2 Compact, Vitek[®] MS y Microflex[®] con el método de referencia PCR panfungal con secuenciación

Método de referencia PCR Panfungal y secuenciación	API [®] 20 C AUX		Vitek [®] 2 Compact		Vitek [®] MS		Microflex [®]	
	Concordancias	Discordancias	Concordancias	Discordancias	Concordancias	Discordancias	Concordancias	Discordancias
<i>C. albicans</i>	35	2	34	1	33	2	35	0
<i>C. parapsilosis</i>	12	0	10	2	12	0	12	0
<i>C. dubliniensis</i>	6	0	6	0	5	1	5	1
<i>C. glabrata</i>	4	0	2	2	4	0	3	1
<i>C. tropicalis</i>	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>C. intermedia</i>	2	0	2	0	2	0	1	1
<i>C. guilliermondii</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>C. lusitanae</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>C. haemulonii</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>C. lipolytica</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>C. fermentati</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Pichia kluyveri</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
Total	67	13	56	11	61	6	61	6

Las pruebas que mostraron menor discordancia fueron las 2 tecnologías de MALDI TOF (Vitek[®] MS y Microflex[®]) con un 9% (6/67).

Figura 3. Análisis comparando metodologías diagnósticas con base a los costos comerciales y al tiempo de procesamiento y obtención de los resultados.



La tecnología MALDI TOF (Microflex y Vitek[®] MS) ofrecen menores tiempos para la identificación de levaduras; sin embargo, nuestros datos reflejan un costo muy razonable y competitivo de la plataforma Microflex[®] (menor valor comercial) comparado con las demás técnicas.

COMENTARIOS

El tamizaje utilizando CHROMagarTM *Candida* permite dar una identificación presuntiva de la especie de *Candida* asociada e identificar la presencia de múltiples especies en una misma muestra clínica.

Se evidenció que los sistemas basados en tecnología MALDI TOF demostraron ser metodologías rápidas, económicas y precisas, las cuales se presentan como alternativas prometedoras para la identificación rutinaria de especies de levaduras del género *Candida*.

La integración de estas metodologías en la rutina de trabajo de los laboratorios permite en poco tiempo la identificación de las especies de levaduras en tiempos cortos y a un bajo costo.

BIBLIOGRAFIA

- Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW., Wiederhold NP. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2016; 30 (1): 13-35.
- Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A, Red de Micología CABA, Argentina. Evaluación del sistema Vitek[®] 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. Rev Argent Microbiol. 2014; 46(2): 107-110.
- Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, Xess I, Paul S, Samantaray JC, et al. MALDI TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. J. Microbiol Methods. 2015; 109: 93-105.
- Jordana-Lluich E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30 (10): 635 – 644.
- Vijayakumar R, Giri S, and Kindo AJ. Molecular species identification of *Candida* from Blood Samples of Intensive Care Unit Patients by Polymerase Chain Reaction – Restricted Fragment Length Polymorphism. J Lab Physicians. 2012; 4 (1): 1 – 4.