

## Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad *in vitro* de especies de *Candida* a los antifúngicos

IVANA MALDONADO<sup>1\*</sup>, LILIANA FERNÁNDEZ CANIGIA<sup>1</sup>, WALTER VIVOT, PATRICIA DOMECCQ<sup>1</sup>, GRACIELA DAVEL<sup>2</sup>, SUSANA CÓRDOBA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sección Microbiología, Laboratorio Central, Hospital Alemán; Av. Pueyrredón 1640 (CP1118) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup> Departamento Micología, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563 (C1282AFF) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: ivanam27@gmail.com

### RESUMEN

Los métodos de referencia E. Def 7.1 y M27-A3, que detectan resistencia *in vitro* a los antifúngicos, son onerosos y muy laboriosos, por lo que su implementación en los laboratorios hospitalarios es limitada. Existen técnicas comerciales de simple realización, que permitirían obtener resultados comparables a los que se obtienen con los métodos estándares. Los objetivos de esta investigación fueron: a) comparar los resultados de concentración inhibitoria mínima obtenidos según el método de referencia E.Def 7.1 con los obtenidos mediante el empleo del equipo comercial ATB<sup>®</sup> Fungus 3 en un conjunto de 82 aislamientos clínicos de *Candida* spp. frente a los siguientes antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol; b) comparar en ese mismo conjunto de aislamientos los resultados del estudio de sensibilidad al fluconazol por difusión en agar empleando tabletas Neo-Sensitabs<sup>™</sup> o discos Malbrán con los que se obtienen por el método de referencia. La concordancia general entre el método de referencia y el ATB<sup>®</sup> Fungus 3 fue del 90,2 %, mientras que la concordancia del método de referencia con los métodos por difusión con discos y con tabletas alcanzó el 96,3% y el 92,7 %, respectivamente. El ATB<sup>®</sup> Fungus 3 fue eficaz para determinar la sensibilidad a la anfotericina B y a la 5-fluorocitosina, pero se observaron discrepancias al evaluar la sensibilidad a los azoles. Los métodos por difusión resultaron útiles para determinar la sensibilidad al fluconazol; sin embargo, observamos 3 discrepancias muy mayores, 1 mayor y 2 menores con el método de difusión con tabletas, mientras que con los discos solo se produjeron 3 discrepancias menores.

**Palabras clave:** *Candida*, levaduras, sensibilidad a los antifúngicos

### ABSTRACT

**Evaluation of three methods for *in vitro* detection of antifungal susceptibility of *Candida* species.** Reference methods E.Def 7.1 and M27-A3 detect *in vitro* resistance; however, they are expensive and very laborious. Thus, their actual use in hospital laboratories is limited. There are commercial techniques available, having easier accessibility and development, which would yield results comparable to those of the reference methods. The objectives of this study were: a) to compare the results of minimal inhibitory concentration of 82 *Candida* spp. clinic isolates according to reference method E.Def 7.1 and ATB<sup>®</sup> Fungus 3; b) to compare the results of fluconazole susceptibility testing by disk diffusion in agar with Neo-Sensitabs<sup>™</sup> tablets and Malbrán disks with those of the reference methods. Minimal inhibitory concentration for amphotericin B, 5-flucytosine, fluconazole and itraconazole was performed according to the E.Def 7.1 and the ATB Fungus 3 methods and diffusion was carried out with fluconazole disks and tablets. General concordance between the reference method and ATB Fungus 3 was 90.2 % and 96.3 and 92.7% for diffusion with disks and tablets. The ATB Fungus 3 method was effective to determine susceptibility against amphotericin B and 5-flucytosine; however, discrepancies were observed with azole drugs. Disk diffusion methods are useful to determine susceptibility to fluconazole; however, 3 very major, 1 major and 2 minor errors were observed with the tablets, whereas only 3 minor errors were observed with the disks.

**Key words:** *Candida*, yeasts, antifungal susceptibility

### INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* y otras especies del género *Candida* son la causa principal de infecciones fúngicas invasoras (candidemia) en pacientes hospitalizados (6, 8, 17, 22, 23).

La implementación del tratamiento antifúngico adecuado dentro de las 12-24 horas de obtener un hemocultivo positivo es de vital importancia, ya que permitiría disminuir en forma significativa la mortalidad asociada a la candidemia (13, 18, 24). Al respecto, Rodero *et al.* comunicaron

que el porcentaje de mortalidad asociada a candidemia en los pacientes que recibieron tratamiento antifúngico fue de 26,3 %, mientras que en los pacientes no tratados fue del 47 % (32). Los métodos de referencia M27-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (3) y el E.Def 7.1 del European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (11) permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a las levaduras. Ambos estándares son fiables, reproducibles y muy útiles para la vigilancia epidemiológica. Gracias

a ellos se puede conocer el perfil de sensibilidad de las distintas especies y, de esa forma, elegir el tratamiento inicial más adecuado. Sin embargo, la realización de estas técnicas es onerosa y muy laboriosa, por lo que su implementación se ve limitada en los laboratorios clínicos.

El fluconazol es la droga de primera línea más usada en los pacientes hospitalizados. Ante la emergencia de cepas resistentes, el CLSI publicó en 2004 el estándar por difusión en agar M44-A (21). De esta forma, es posible determinar de manera rápida la sensibilidad al fluconazol en levaduras del género *Candida* (14, 29, 30, 35). Por otra parte, en el Departamento de Micología INEI, ANLIS "Dr. C. Malbrán" se desarrolló y estandarizó un método de difusión en agar que utiliza discos de papel cargados con fluconazol. Este método permite realizar como práctica de rutina en los laboratorios el tamizaje de los aislamientos clínicos y conocer el nivel de sensibilidad de las levaduras del género *Candida* frente al citado agente (31). Además, están disponibles en el mercado equipos que permiten determinar la sensibilidad a los antifúngicos por microdilución o por difusión en agar. El sistema ATB® Fungus 3 (bioMérieux, Francia) involucra una técnica de dilución en caldo, no colorimétrica, basada en el M27-A del CLSI, mientras que las tabletas Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica A/S, Dinamarca) se utilizan para la determinación de la sensibilidad por difusión en agar (34).

Es importante conocer el perfil de sensibilidad de los aislamientos clínicos, no solo para elegir la mejor alternativa terapéutica, sino también para vigilar la epidemiología de la resistencia y colaborar con la elección de los tratamientos empíricos iniciales más adecuados. En el comercio existe una amplia variedad de equipos potencialmente útiles para realizar la determinación de la sensibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos; sin embargo, es aconsejable que los laboratorios evalúen estas técnicas y las comparen con los estándares antes de decidir su implementación en la rutina.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) comparar las CIM de cuatro antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol) obtenidas por microdilución según el método de referencia E. Def 7.1 del EUCAST (en adelante, MR) con las determinadas mediante el sistema comercial ATB® Fungus 3 (en adelante, ATB F3) en 82 aislamientos clínicos de *Candida* spp.; b) comparar los resultados de sensibilidad al fluconazol que se obtienen por el método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs (en adelante, T) y con el método de discos desarrollado por el Instituto Malbrán (en adelante, DM) con los que arroja el método de referencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se estudiaron 62 aislamientos de *Candida* spp. obtenidos de pacientes de ambos sexos, hospitalizados y ambulatorios, que fueron atendidos en el Hospital Alemán de la Ciudad Autó-

noma de Buenos Aires durante el período 2005-2008. Además, se incluyeron en el estudio 20 aislamientos de *Candida* spp. pertenecientes a la colección de cultivos del Departamento de Micología INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Las siguientes especies del género *Candida* fueron incluidas en el estudio: *Candida albicans* (n = 37), *C. tropicalis* (n = 18), *C. glabrata* (n = 10), *C. parapsilosis* (n = 9), *C. krusei* (n = 4), *C. guilliermondii* (n = 2), *C. famata* (n = 1), *C. inconspicua* (n = 1).

### Identificación de los microorganismos

Las levaduras fueron identificadas a nivel de especie mediante el estudio de las características micromorfológicas en agar leche con Tween 80 al 1 %, el cultivo en CHROMagar Candida® (CHROMagar Company Ltd., Francia) y la evaluación de la asimilación de fuentes de carbono con ID 32C (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Los aislamientos del Departamento de Micología INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" fueron identificados utilizando pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas según el método de Kurtzman *et al.*, con modificaciones (7, 16).

### Pruebas de sensibilidad *in vitro*

**Concentración inhibitoria mínima:** se utilizó el método de referencia E. Def 7.1 del EUCAST (11).

- Medio de cultivo: se utilizó RPMI 1640 con 2 % de glucosa, tamponado a pH 7 con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma, Argentina) 0,165 M.

- Antifúngicos: se ensayó la actividad *in vitro* de la anfotericina B (AMB), la 5-fluorocitosina (5-FC) (Sigma, Argentina), el fluconazol (FZL) (Pfizer, S. A., Argentina) y el itraconazol (ITR) (Janssen, Argentina). Las soluciones *stock* de AMB, ITR y FZL se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Argentina), y la de 5-FC en agua destilada estéril. Los rangos de concentraciones probados fueron 0,015 a 16 µg/ml para la AMB y el ITR y de 0,13 a 128 µg/ml para la 5-FC y el FZL. La CIM se determinó en placas de 96 pocillos, fondo plano (Nunclon 167008, Nunc, Naperville, IL, EE.UU.).

- Inóculo: se realizó a partir de un cultivo de 24 horas a 35 °C en agar YM (extracto de malta 0,3 %; extracto de levadura 0,3 %; peptona 0,5 %; glucosa 1 %; agar 2 %). Se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril (solución salina 0,85 %) (SSE) (1-5 x 10<sup>6</sup> UCF/ml).

Se sembraron las placas y se incubaron durante 24 y 48 horas. La lectura se realizó en un lector a 405 nm (LabSystems Multiskan Multisoft, Basingstoke, Reino Unido). Para calcular el 100 % de crecimiento, se promedió la absorbancia de las celdas controles sin droga. Se consideró CIM de AMB a aquella concentración que provocó una disminución de la densidad óptica del 95 % comparada con la del control de crecimiento, mientras que para los azoles y la 5-FC se consideró una reducción del 50 %.

Puntos de corte: recientemente el EUCAST publicó los siguientes puntos de corte en µg/ml: FZL, sensible (S) ≤ 2, sensible dependiente de la dosis (DD) 4, resistente (R) > 4; voriconazol, S ≤ 0,125, R > 0,125. Para los restantes antifúngicos, se consideraron los siguientes puntos de corte: 5-FC, S ≤ 4, DD 8-16 y R ≥ 32; ITR, S ≤ 0,13, DD 0,25-0,50 y R ≥ 1; AMB, S ≤ 1, R > 2. Cabe aclarar que para este último agente no hay puntos de corte establecidos, por lo que se utilizaron los sugeridos según las CIM poblacionales de los aislamientos (3). ATB F3: la técnica se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. El sistema ATB F3 consiste en una galería que contiene 16 pares de cúpulas. El primer par, sin antifúngico, es para el control de crecimiento. Los 15 pares siguientes contienen 5 antifúngicos con los siguientes rangos de concentración en µg/ml: 5-FC, 4-16; AMB, 0,5-16; FZL, 0,25-128; ITR, 0,125-4; y VCZ 0,06-8. En el presente estudio no se evaluó la sensibilidad de los aislamientos de *Candida* spp. frente al voriconazol.

- Inóculo: a partir de un cultivo puro de 24 horas se realizó una suspensión de turbidez equivalente a 2 de la escala McFarland, luego se transfirieron 20 µl de esta suspensión al ATB F3 Medium

y se procedió a inocular las galerías, se distribuyeron 135  $\mu$ l de ATB F3 Medium por cúpula ( $3 \times 10^4$  levaduras/ml o  $4 \times 10^3$  levaduras por cúpula). Se colocó la galería en un contenedor hermético con un papel absorbente humedecido. Se incubó durante 24 horas ( $\pm 2$  horas) en aerobiosis a 35 °C. Cuando el crecimiento fue insuficiente, se incubó 24 horas más. En todos los ensayos se verificó la presencia de un crecimiento suficiente en las cúpulas testigo. La lectura se realizó de manera visual.

Se tomaron como puntos de corte los valores de CIM en  $\mu$ g/ml considerados por el fabricante: AMB,  $S \leq 1$  y  $R > 2$ ; 5-FC,  $S \leq 4$ , DD 8-16 y  $R \geq 32$ ; FZL,  $S \leq 8$ , DD 16-32 y  $R \geq 64$ ; e ITR,  $S \leq 0,13$ , DD 0,25-0,50 y  $R \geq 1$ .

#### Métodos de difusión en agar

- Antifúngico: se evaluó el fluconazol. La carga de fluconazol fue de 25  $\mu$ g por disco y por tableta.

- Inóculo: se preparó un inóculo de turbidez 0,5 de la escala de McFarland en SSE a partir de un cultivo de 24 horas a 35 °C en agar YM. Se utilizaron placas de Petri con medio Mueller-Hinton, con el agregado de 2 % de glucosa y azul de metileno, concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml (MHM). Las placas se sembraron por inundación, previa dilución 1/10 en 5 ml de SSE a partir del inóculo inicial. Se inundó la placa de MHM con 5 ml del inóculo inicial diluido, se dejó en contacto 5 minutos y se extrajo el líquido excedente. Los discos/tabletas se colocaron sobre la superficie del agar de la placa previamente inoculada con la ayuda de una pinza estéril. Luego las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas; si transcurrido este tiempo los halos no eran claramente distinguibles, se prolongó la incubación 24 horas más. La lectura se realizó con la ayuda de una regla para medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición. Se asumió que las colonias más pequeñas que desarrollaron dentro de la zona de inhibición obedecieron a un efecto de crecimiento residual, por lo que no se las consideró como mutantes resistentes (31, 34).

- Interpretación de los resultados.

Ensayo con discos Malbrán (DM): se consideró sensible al aislamiento que produjo un diámetro del halo  $\geq 16$  mm; a los aislamientos que presentaron un diámetro del halo  $< 16$  mm se les determinó la sensibilidad al fluconazol por el método de referencia (CIM) (31).

Ensayo con tabletas Neo-Sensitabs (T): cuando el diámetro

del halo fue  $>19$  mm se consideró sensible; si el diámetro del halo estaba entre 18 y 15 mm se consideró sensible dependiente de la dosis, y cuando el diámetro del halo fue de  $\leq 14$  mm se consideró resistente (34).

Para los métodos estudiados se observaron distintas categorías de discrepancias. Las discrepancias muy mayores se calcularon sobre el número de aislamientos que fueron clasificados como sensibles por los métodos de ATB F3, DM o T y como resistentes por el MR. Las discrepancias mayores se determinaron por el número de cepas resistentes por los métodos ATB F3, DM o T y sensibles por el MR. Las discrepancias menores se definieron cuando por uno de los métodos el resultado fue sensible dependiente de la dosis y por el otro sensible o resistente.

#### Análisis estadístico

La CIM se determinó por el método de referencia y se correlacionó con el diámetro de los halos de inhibición obtenidos mediante los métodos de difusión utilizados (discos y tabletas). Para conocer el grado de asociación entre el método de referencia y los métodos de difusión, se realizaron los correspondientes análisis de regresión lineal ( $r$ ) y se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson ( $r^2$ ). Además, se calculó el porcentaje de concordancia entre el método de referencia y los métodos por difusión.

#### Control de calidad

Se utilizaron las cepas de referencia: *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 (3, 11, 21).

## RESULTADOS

Cuando se evaluó el grado de asociación entre el DM y el MR, el valor de la regresión lineal fue  $r = 0,69$  y el coeficiente de correlación de Pearson  $r^2 = 0,48$ ,  $p = 0,00$ ; mientras que con las T se obtuvo un  $r = 0,57$ ,  $r^2 = 0,33$  y  $p = 0,00$ , respectivamente. El porcentaje de concordancia entre el MR y el ATB F3 fue del 98,8 %, 91,5 %, 91,5 % y 79,3 % para la AMB, la 5-FC, el FZL y el ITR, respectivamente. La concordancia entre el MR y la difusión con DM y T para el FZL fue del 96,3 y

**Tabla 1.** Evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de *Candida* spp. con el método de referencia\*, con el sistema comercial ATB Fungus 3 y con métodos de difusión. Discrepancias entre las metodologías evaluadas.

Categoría	Métodos									
	Método de Referencia*				ATB Fungus 3				Difusión FZL	
	AMB	5-FC	FZL	ITR	AMB	5-FC	FZL	ITR	Disco Malbrán	Tableta Neo-Sensitabs
Sensibles	82	78	72	70	81	75	72	62	73	75
DD	–	2	4	10	–	0	5	12	–	2
Resistentes	0	2	6	2	1	7	5	8	9	5
Total	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
Discrepancias										
D. muy mayores					0	1	2	3	0	3
D. mayores					1	1	2	1	0	1
D. menores					0	5	3	13	3	2

D: discrepancias; DD: sensible dependiente de la dosis; AMB: anfotericina B; FZL: fluconazol; ITR: itraconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina. \* E.Def 7.1 del EUCAST

92,7 %, respectivamente.

Para la AMB, el 100 % (82/82) de los aislamientos evaluados mostró valores de CIM  $\leq$  1  $\mu$ g/ml por el MR, pero por el sistema ATB F3 un aislamiento resultó resistente. Según el MR, el 95,1 % (78/82) fue sensible a la 5-FC; 87,8 % (72/82) fue sensible al FZL y 85,4 % (70/82) fue sensible al ITR. Para el ATB F3, las mayores discrepancias se observaron con el ITR, con un 75,6 % (62/82) de los aislamientos sensibles. En la Tabla 1 se muestra la distribución por categorías de sensibilidad según el método y el antifúngico evaluado.

Cuando se evaluó la actividad *in vitro* de la AMB, solo un aislamiento de *C. albicans* mostró una discrepancia mayor. Sin embargo, se observaron las siguientes discrepancias según el antifúngico y la especie evaluada: a) 5-FC, 1 discrepancia muy mayor con *C. tropicalis*; 1 discrepancia mayor con *C. albicans*; 5 discrepancias menores (1 con *C. albicans*, 3 con *C. krusei* y 1 con *C. tropicalis*); b) FZL, 2 discrepancias muy mayores (1 con *C. glabrata* y 1 con *C. krusei*); 2 discrepancias mayores con *C. krusei*; 3 discrepancias menores (2 con *C. tropicalis* y 1 con *C. guilliermondii*).

El mayor número de discrepancias se observó con ITR. Hubo 3 discrepancias muy mayores (2 de ellas con *C. glabrata* y 1 con *C. inconspicua*); una discrepancia mayor con *C. glabrata* y 13 discrepancias menores (2 con *C. albicans*, 2 con *C. krusei*, 2 con *C. glabrata*, 5 con *C. tropicalis* y 2 con *C. guilliermondii*). Para los métodos por difusión se evaluó únicamente el FZL. Con los discos Malbrán, solo hubo 3 discrepancias menores, 2 con *C. tropicalis* y 1 con *C. glabrata*. Con las tabletas Neo-Sensitabs se observaron las siguientes discrepancias: 3 muy mayores (1 con *C. albicans*, 1 con *C. glabrata*, 1 con *C. krusei*); 1 discrepancia mayor con *C. krusei* y 2 discrepancias menores, 1 con *C. krusei* y 1 con *C. tropicalis*.

Las especies que mostraron mayores discrepancias con los métodos evaluados fueron *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* cuando se determinó la sensibilidad a los azoles.

## DISCUSIÓN

Las infecciones del torrente sanguíneo por levaduras del género *Candida* tienen un significativo impacto en la evolución clínica de los pacientes, cuyo desenlace suele ser fatal si no se implementa un tratamiento antifúngico adecuado dentro de las 24 horas de establecido el diagnóstico de candidemia (8, 19, 24, 32). Además, el uso cada vez más frecuente de drogas triazólicas en el tratamiento de infecciones fúngicas oportunistas y el hecho de que haya un número más elevado de pacientes inmunocomprometidos trajeron aparejado un cambio en la distribución de especies de levaduras asociadas a estas infecciones. Por eso es importante conocer el espectro de actividad de los antifúngicos frente a aislamientos

clínicos (20, 22, 25-28).

Los documentos M27-A3 (3) y E.Def 7.1 (11) son los estándares reconocidos para determinar la sensibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos. Estos estándares son fiables, reproducibles y muy útiles para la vigilancia epidemiológica; sin embargo, su aplicación en los laboratorios clínicos se ve limitada.

La introducción del fluconazol en tratamientos empíricos y profilácticos en los últimos 30 años tuvo como consecuencia, tanto en niños como en adultos, un cambio en la epidemiología de la candidiasis invasora (22). Es así como en algunos países, *C. krusei* y *C. glabrata* ocupan un lugar prevalente por ser especies resistentes o menos sensibles al fluconazol. También es cada vez más frecuente la aparición de *C. albicans*, *C. tropicalis* o *C. parapsilosis* resistentes a los azoles (25). Estos cambios incrementaron el interés por desarrollar una técnica estandarizada, reproducible y más simple, con capacidad para detectar la sensibilidad *in vitro* a este antifúngico. En respuesta a la demanda, en 2004 el CLSI desarrolló y publicó el documento estándar M44-A (21), que sienta las bases para realizar difusión en agar con discos de fluconazol y que identifica de manera rápida la sensibilidad a fluconazol en levaduras del género *Candida*. El estándar recomienda realizar una lectura automatizada de los halos, la cual requiere de un equipo con un *software*. Dado su alto costo, este equipo es poco accesible para la mayoría de los laboratorios clínicos de nuestro país (14, 28, 29, 35).

En el Departamento de Micología INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" se desarrolló y estandarizó un método de difusión en agar que utiliza discos de papel cargados con fluconazol. Esta técnica es aplicable a la rutina de los laboratorios y permite conocer el perfil de sensibilidad de levaduras del género *Candida* frente a fluconazol (31).

Por otra parte, existen diferentes técnicas disponibles en el comercio que son, por lo general, de fácil realización, económicas y pueden ser utilizadas en los laboratorios clínicos. Sin embargo, los resultados que se obtienen no siempre tienen correlación con el método de referencia, motivo por el cual algunas de ellas pueden presentar problemas a la hora de determinar la sensibilidad a los antifúngicos.

En nuestro estudio, la concordancia general entre el método ATB F3 y el método de referencia fue del 90,2 %, ambos métodos son comparables para la mayoría de los antifúngicos evaluados. El itraconazol fue la droga con más baja concordancia (79,3 %). Nuestros resultados fueron similares a los que obtuvieron otros autores con el ATB F2 (4, 5, 9, 15, 33). Asimismo, la mayor cantidad de discrepancias se observaron con *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* frente a los antifúngicos triazólicos.

En este sentido, Eraso *et al.* compararon el ATB F2 con el Sensititre Yeastone y concluyeron que el ATB F2 es una alternativa simple, efectiva y reproducible para

determinar la actividad antifúngica de la 5-FC y la AMB; sin embargo, con FZL e ITR es menos eficaz debido a que encontró discrepancias muy mayores con algunos aislamientos (9). Por otra parte, Torres-Rodríguez y Alvarado-Ramírez (33) compararon el ATB F2 con el Sensititre Yeastone y el M27-A2 y observaron que el ATB F2 tuvo una concordancia global mayor del 95 % con la lectura visual por ambos métodos. Cuando compararon el ATB F2 con el M27-A2, la lectura visual mostró mejor porcentaje de concordancia que la lectura automatizada para los antifúngicos evaluados (AMB, 100 % vs. 97 %; 5-FC, 100 % vs. 97 %; FZL, 97 % vs. 93 %; ITR, 98 % vs. 89 %). Las CIM más altas se debieron al fenómeno de crecimiento residual, particularmente con *C. tropicalis* y algunos aislamientos de *C. albicans*; este hallazgo también fue informado por Cuenca-Estrella *et al.* en sus trabajos (4, 5).

El fabricante del sistema comercial ATB F3 recomienda interpretar como sensibilidad intermedia a los aislamientos de *C. glabrata* que presentan un resultado sensible al fluconazol o al itraconazol, debido a la sensibilidad media natural de esta especie a estos antifúngicos. En nuestro trabajo se interpretaron los resultados según el valor de la CIM y se asignaron las categorías de resistente, sensible dependiente de la dosis o intermedio y sensible, independientemente de la especie. Se conoce que *C. glabrata* puede adquirir resistencia secundaria a los antifúngicos azólicos; por ese motivo no se recomienda el uso de fluconazol (30). En este sentido, recientemente el EUCAST comunicó nuevos puntos de corte en  $\mu\text{g/ml}$  para fluconazol, sensible  $\leq 2$  y resistente  $> 4$  para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; y recomienda no evaluar la sensibilidad a este azol en aislamientos de *C. glabrata* y *C. krusei*. Una excepción a esto es cuando se recupera *C. glabrata* de infecciones del tracto urinario, donde la concentración de fluconazol en la orina podría exceder la CIM de la especie (30).

Algunas especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* pueden presentar el fenómeno de crecimiento residual, que implica una sobreestimación de la CIM de los antifúngicos nitrogenados (fluconazol, itraconazol). Con el ATB F3 este problema sería mayor si la lectura fuese automatizada, según las indicaciones del fabricante.

Cuenca-Estrella *et al.* (9) comunicaron la existencia de un 5,4 % de discrepancias muy mayores con las tabletas Neo-Sensitabs, por lo que no recomiendan esta técnica para detectar aislamientos resistentes al fluconazol.

Espinel Ingroff *et al.* (10) obtuvieron un 95,5 % de concordancia entre el método de referencia M27-A2 y las tabletas Neo-Sensitabs para fluconazol y no detectaron discrepancias muy mayores ni mayores. En nuestro trabajo, la concordancia fue del 92,7 % y detectamos un 3,6 %, 1,2 % y 2,4 % de discrepancias muy mayores, mayores y menores, respectivamente.

Por su parte, Vandenbosche *et al.* encontraron numerosas discrepancias y sugieren cambiar los puntos de corte de resistente  $\leq 16$  mm y sensible  $\geq 30$  mm a

resistente  $\leq 10$  mm y sensible  $\geq 21$  mm, para disminuir las discrepancias muy mayores (35).

Cantón *et al.* (2) evaluaron la utilidad de las tabletas Neo-Sensitabs frente a fluconazol y encontraron que las discrepancias muy mayores surgieron en *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, y concluyen que las tabletas pueden utilizarse para determinar la sensibilidad al fluconazol; sin embargo, señalan que el punto de corte para definir la resistencia debería ser  $<17$  mm. En nuestro estudio, las discrepancias fueron principalmente con *C. glabrata* y *C. krusei*, aunque también las hubo con *C. albicans* y *C. tropicalis*.

El sistema ATB F3 y el método por difusión con discos Malbrán pueden ser utilizados con confianza en los laboratorios clínicos para determinar la sensibilidad de aislamientos de *Candida* spp. a los antifúngicos. Sin embargo, para aquellos aislamientos que fuesen resistentes o sensibles dependientes de la dosis por estos métodos, es recomendable confirmar la sensibilidad por el método estándar por dilución. Debido a las discrepancias muy mayores que se advirtieron, las pruebas con tabletas Neo-Sensitabs no serían un procedimiento confiable para el análisis de sensibilidad a fluconazol, aunque las mayores discrepancias se observaron con *C. glabrata* y *C. krusei*; especies que tienen una sensibilidad disminuida al fluconazol o resistencia intrínseca, respectivamente. En las últimas recomendaciones se sugiere no determinar la sensibilidad a este antifúngico en estas especies; podríamos decir que el alerta debería estar con aislamientos de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

En conclusión, el ATB F3 es un método eficaz y confiable para determinar la sensibilidad a la anfotericina B y a la 5-fluorocitosina. Sin embargo, presenta algunas limitaciones con las especies *C. glabrata* y *C. krusei* y con el antifúngico fluconazol. Asimismo, es conveniente evaluar al itraconazol con el método de referencia, por ser la droga que presenta mayores discrepancias.

Con respecto a los métodos de difusión con discos o tabletas, puede afirmarse que son asequibles, de fácil realización y detectan aislamientos sensibles a fluconazol. Es importante destacar que en nuestro trabajo no se observaron discrepancias muy mayores con el método de difusión con discos Malbrán, mientras que sí se observaron con las tabletas Neo-Sensitabs.

Es recomendable que cada laboratorio, antes de implementar estos métodos, realice los estudios comparativos correspondientes para evaluar la correlación que existe entre el método comercial y el método estándar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion Methods. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1781-4.
2. Cantón E, Pemán J, Sastre M, Valentín A, Bosch M, Espinel-Ingroff A. Evaluación y utilidad de los métodos E-test® y Neo-

- Sensitabs® para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19: 267-74.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third Edition, 2008; M27-A3. Wayne, Pa 19087-1898, USA.
  - Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 486-92.
  - Cuenca-Estrella M, Mellado E, Gómez-López A, Perkins A, Buitrago MJ, Rodríguez-Tudela JL. Evaluation of the commercial method ATB® F2 for the detection *in vitro* of antifungal resistance and its correlation with the reference method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST), and the micromethod of the NCCLS. Poster M-1601, 45<sup>th</sup> Annual ICAAC, New Orleans, September 2005.
  - Davel G, Canteros C. Situación de las micosis en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39: 28-33.
  - Davel G, Nuñez V, Mancebo G. Métodos de identificación de levaduras basado en sus propiedades bioquímicas y fisiológicas. V Congreso Argentino de Micología, XV Jornadas Argentinas de Micología, 1991, p. 59, Santa Fe, Argentina.
  - Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesth Analg* 2008; 106: 2523-9.
  - Eraso E, Ruesga M, Villar-Vidal M, Carrillo-Muñoz AJ, Espinel-Ingroff A, Quindós G. Comparative evaluation of ATB® Fungus 2 and Sensititre YeastOne panels for testing *in vitro* *Candida* antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 3-6.
  - Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 858-64.
  - EUCAST Definitive Document E.Def 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 398-405.
  - EUCAST technical Note on fluconazole. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 193-5.
  - Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 419-25.
  - Finquelievich JL, Iovannitti CA, Mujica MT, Relloso S, Carnovale S, de Elias Costa MR, Jewtuchowicz V, Espinel-Ingroff A. Susceptibility of *Candida* species to fluconazole assayed by a disk diffusion method with automated reading versus a microdilution method. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35: 214-8.
  - Guelfand L, Tilli P, Sinigaglia S, Vivot W, Kaufman S, Davel G, Rodero L. Evaluación del Método ATB® Fungus 2 para determinar la sensibilidad a fluconazol, itraconazol y anfotericina B frente a *Candida* spp. X Congreso Argentino de Micología y XX Jornadas Argentinas de Micología. 2005, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
  - Kurtzman CP, Fell JW. The Yeasts, a taxonomic study. 4<sup>th</sup> edition. Amsterdam. The Netherlands, Elsevier Science Publisher, 1998.
  - Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
  - Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, Harrison LH, Seaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch S. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 540-7.
  - Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3640-5.
  - Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 107-12.
  - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline, 2004; M44-A. Wayne, Pa, USA.
  - Palacio A, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 2-7.
  - Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485-506.
  - Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, Laupland KB. Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 613-8.
  - Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
  - Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ, The SENTRY Participant Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 852-6.
  - Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA for The SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1886-9.
  - Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 747-51.
  - Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar RJ, Hollis RJ, Diekema DJ. Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS Global Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3607-12.
  - Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on antifungal susceptibility testing of the National Committee for Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-47.

31. Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfield P, Olguín C, Cuirolo A, Soria M, Guelfand L, Canteros CE, Davel G, Red WHONET. Métodos de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 155-63.
32. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, Saporiti A, Participantes del Grupo EMIFN. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 189-95.
33. Torres- Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E. *In vitro* susceptibilities to yeasts using the ATB<sup>®</sup> Fungus 2 method, compared with Sensititre Yeastone<sup>®</sup> and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 658-61.
34. User's Guide Neo-Sensitabs<sup>™</sup> Susceptibility testing, 18<sup>th</sup> Ed. 2005/2006. Rosco Diagnostica A/S.
35. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevence M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-Test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 918-21.