

Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp.

L. RODERO^{1,2}, S. CÓRDOBA¹, W. VIVOT¹, M. CAMPO², P. CORFIELD², C. OLGUÍN¹, A. CUIROLO¹, M. SORIA¹, L. GUELFAND², C. E. CANTEROS¹, G. DAVEL¹, RED WHONET**

¹Departamento Micología, INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Avenida Vélez Sarsfield 563 (C1282AFF) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²Cátedra de Microbiología, Universidad Católica Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: gdavel@anlis.gov.ar

RESUMEN

Se estudiaron 1193 aislamientos clínicos para estandarizar y evaluar un método de difusión con discos de fluconazol de lectura visual, que permita detectar levaduras sensibles al antifúngico. Las especies analizadas fueron: *Candida albicans* (n=584), *Candida parapsilosis* (n=196), *Candida tropicalis* (n=200), *Candida glabrata* (n=113), *Candida krusei* (n=50), *Candida* spp. y otras levaduras oportunistas (n=50). Los discos fueron manufacturados en el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Se midieron los halos de inhibición del crecimiento producidos por fluconazol y la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de referencia M27-A2 modificado por EUCAST. Se establecieron los valores de corte del método de difusión en: ≥ 16 mm para levaduras sensibles a fluconazol (CIM ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$), entre 9 y 15 mm para sensibles dependientes de la dosis (CIM = 16-32 $\mu\text{g/ml}$) y ≤ 8 mm para resistentes (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$). El método de difusión tuvo 94,7% de concordancia con el de referencia, con 0,2% de errores *very major* y 0,3% de errores *major*. La reproducibilidad inter e intralaboratorio fue muy buena. Para detectar aislamientos sensibles a fluconazol, este método resulta confiable y de bajo costo; sin embargo, es conveniente que los aislamientos con halos ≤ 15 mm sean reevaluados por el método de referencia.

Palabras clave: *Candida* spp., levaduras, sensibilidad a fluconazol, difusión en agar

ABSTRACT

Disk diffusion method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* spp. isolates. In order to standardize and evaluate a disk diffusion method with visual reading to detect *in vitro* fluconazole susceptibility of yeast, 1193 clinical isolates were tested. These included 584 *Candida albicans*, 196 *Candida parapsilosis*, 200 *Candida tropicalis*, 113 *Candida glabrata*, 50 *Candida krusei* and 50 *Candida* spp. and other opportunistic yeasts. The disks were manufactured in the INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". The disk diffusion method results were compared to MIC results obtained by the reference CLSI M27-A2 broth microdilution method modified by EUCAST. The interpretative breakpoints for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole were established at: zone diameter ≥ 16 mm for MIC ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ (susceptible isolates), between 9 and 15 mm for MIC = 16-32 $\mu\text{g/ml}$ (susceptible dose-dependent isolates), and ≤ 8 mm for MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ (resistant isolates). Overall agreement between the two methods was 94.7%, with 0.2% very major errors, and 0.3% major errors. Inter- and intralaboratory agreement was good. The disk diffusion method for drug susceptibility testing of *Candida* spp. isolates is inexpensive, reliable and reproducible. However, when the inhibition zone diameter is ≤ 15 mm, it is advisable to test the isolate by the reference microdilution method.

Key words: *Candida* spp., yeasts, fluconazole susceptibility, agar diffusion

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 30 años, la incidencia de las candidemias aumentó aproximadamente en un 500% en

los hospitales de alta complejidad, y la mortalidad asociada oscila entre 33 y 52% (1, 6, 23). Los resultados de un estudio realizado en el Departamento de Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" mostraron que el

**RED WHONET: Miryam Vázquez, Adriana Procopio, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez; Marta Altschuler y Héctor Demkura, Hospital de Agudos Sor María Ludovica; Ana María Littvik, Hospital Guillermo Rawson; Liliana Guelfand, Hospital Fernández; Marta Tokumoto, Analía Fernández, Fundación Favalaro; Beatriz García, Hospital Humberto Notti; Adriana Pereyra, Hospital Gobernador Centeno y Hospital Lucio Molas; Liliana Lauro, María del Carmen Mora, Hospital Piñero; María Cristina Redondo, Hospital Dr. Julio C. Perrando; María Silvana Vivaldo, Hospital de la Madre y el Niño de Formosa; Nora Alejandra Gómez, Hospital Cosme Argerich; Clara Mayoral, Melanía Noroña, María Rosa Baroni, Hospital de Niños Dr. O. Alassia; Marina Bottiglieri, Clínica Privada Reina Fabiola; Lidia Wolff de Jacob, Clínica Privada Vélez Sarsfield; Silvia Yudowsky, Hospital Infantil Municipal de Córdoba, Rodolfo Notario, Hospital Español - Instituto ABC; Jorgelina Mulki, Hospital Materno Infantil y Sanatorio Parque de Salta; Adriana Di Bella y Paula Carece, Hospital Nacional Posadas; María Silvia Weibel, Hospital Pablo Soria de Jujuy; Clara Kremer, Hospital Provincial Dr. Castro Rendón de Neuquén, Hortensia Cano; Hospital Regional Río Gallegos.

porcentaje de mortalidad asociada a candidemias en los pacientes que recibieron tratamiento antifúngico fue de 26,3%, mientras que en los pacientes no tratados fue de 47%. El análisis estadístico de ambas series de pacientes demostró que el resultado clínico (muerte/supervivencia) depende del empleo de antifúngicos (25).

En la actualidad, existen diversos antifúngicos que pueden utilizarse para el tratamiento de las micosis sistémicas y hay un buen número en desarrollo. Con el aumento de estas infecciones, se incrementó el interés por los antifúngicos y por el desarrollo de técnicas *in vitro* para la detección de la sensibilidad a estas drogas, con el fin de proveer datos relevantes en la elección del tratamiento.

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antes National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), estandarizó un método de referencia por técnicas de macro y microdilución que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antifúngicos frente a las levaduras (15). Sin embargo, esta metodología es laboriosa y de difícil aplicación en la rutina de los laboratorios hospitalarios. Por estas razones, estas pruebas se limitaron a centros de referencia, que tienen la experiencia necesaria como para asegurar que los resultados obtenidos sean confiables y puedan ayudar a un mejor manejo de la terapéutica de estas infecciones.

El uso de fluconazol como droga de primera línea en pacientes hospitalizados, y la emergencia de aislamientos resistentes, incrementó en todo el mundo el interés en desarrollar una técnica estandarizada y reproducible, que permita determinar la sensibilidad *in vitro* a este antifúngico de una manera rápida y fácil de aplicar en la rutina de los laboratorios hospitalarios (12, 18, 20-22, 28).

En el año 2004 el CLSI publicó el documento M44-A, que sienta las bases de un método de difusión en agar con discos de fluconazol, capaz de evaluar la sensibilidad de levaduras del género *Candida*. En ese documento se propone la utilización del medio de cultivo Mueller-Hinton, empleado en la rutina de los laboratorios para realizar pruebas de sensibilidad en bacterias (14). Estudios realizados por diferentes autores demostraron una buena correlación entre el método de difusión con discos de fluconazol (CLSI, M44-A) y el método de microdilución de referencia (CLSI M27-A2); sin embargo, la mayoría de estos autores emplearon un sistema automatizado de lectura (3, 11, 13, 16, 19, 27). El equipo sugerido, denominado BIOMIC, permite determinar el equivalente al 80% de inhibición del crecimiento, como lo establece el CLSI para los azoles, de forma exacta y objetiva. El costo de este equipo de lectura, no obstante, hace que el método sea inaccesible para los laborato-

rios de hospitales en países en vías de desarrollo, que es donde esta metodología sería de mayor utilidad dada su simplicidad.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la metodología de difusión en agar utilizando discos de papel cargados con fluconazol y lectura visual. La técnica, accesible a la rutina de los laboratorios, permitiría identificar los aislamientos de levaduras del género *Candida*, sensibles a fluconazol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio multicéntrico

Se realizó un estudio de corte transversal, prospectivo, durante el período de abril de 2002 a marzo de 2004. En él participaron 21 laboratorios integrantes de la RED WHONET y el Departamento Micología del INEI- ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

El Departamento Micología produjo los discos de papel cargados con fluconazol y controló su calidad. Cada centro recibió los discos, dos cepas de referencia para control de calidad del método, y el protocolo para la realización de la prueba de difusión en agar.

Los laboratorios participantes identificaron todos los aislamientos de levaduras provenientes de hemocultivos durante el período que abarcó el estudio, registraron en un formulario de derivación realizado *ad hoc* los datos epidemiológicos (edad, sexo, fecha de internación del paciente, fecha de recolección del primer hemocultivo positivo, enfermedad de base, factores de riesgo asociados, tratamiento antifúngico y supervivencia), realizaron la prueba de difusión, midieron los halos de inhibición y volcaron los resultados en la planilla correspondiente del programa WHONET. Se incluyeron, además, aislamientos de otros especímenes clínicos, detectados previamente como resistentes por otros métodos.

Los aislamientos junto con el formulario se enviaron al Departamento Micología, donde se confirmó la identidad de las levaduras, se repitió la prueba de difusión y se determinó la CIM a fluconazol utilizando el método de referencia. Los resultados de estos estudios se agregaron a la planilla del programa WHONET para el análisis final.

Microorganismos

Se utilizaron 1193 aislamientos de levaduras recuperadas en los laboratorios de la Red WHONET, para determinar la correlación entre la CIM (método de referencia) y el halo de inhibición (método de difusión).

Para controlar la calidad de las pruebas de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución y el de difusión en agar, se utilizaron dos cepas de referencia: *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (14, 15). Estas cepas se utilizaron, además, para evaluar la reproducibilidad intralaboratorio.

Para evaluar la reproducibilidad interlaboratorio se empleó un panel de 59 cepas utilizado por el EUCAST, que incluye aislamientos sensibles (S), sensibles dependientes de dosis (SDD) y resistentes (R) al fluconazol, y las dos cepas de referencia sugeridas para control de calidad (8, 14, 15).

Identificación de los aislamientos clínicos

Las levaduras identificadas en cada laboratorio participante fueron reaisladas en agar morfología (Difco Laboratorios, Detroit, MI, USA) y CHROMagar™ *Candida* (París, Francia) e identificadas nuevamente en el Departamento Micología. Se realizaron las pruebas de producción de tubo germinativo (30) y formación de clamidoconidios en medio de bilis de Feo (9). Cuando ambas pruebas resultaron positivas, la levadura fue identificada como

Candida albicans. Los aislamientos restantes fueron identificados utilizando pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas, según la metodología de Kurtzman modificada (5).

Determinación de la sensibilidad *in vitro*

Método de microdilución

Para determinar la CIM del fluconazol se utilizó un micro-método en medio líquido basado en el método de referencia CLSI M27-A2, modificado por Rodríguez-Tudela *et al.* (4, 26). El medio de cultivo empleado fue RPMI 1640 (GIBCO BRL, NY, USA), buffer ácido morfolino propano sulfónico (MOPS, SIGMA Chemical Co, St. Luis, MO, USA) 0,165 M pH 7,0, con el agregado de 2% de glucosa (SIGMA). Las microplacas de 96 pocillos de fondo plano (NUNC, Dinamarca) se cargaron con fluconazol (Pfizer S. A., Argentina), en un rango de 0,25 a 128 mg/ml, se inocularon con 50 µl de una suspensión de levaduras cuya turbidez se equiparó al N° 1 de la escala de McFarland. Luego de una incubación de 24 h, se realizó la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan Multisoft, Basingstoke, UK). Se calculó el 100% de crecimiento promediando la absorbancia de las celdas control sin droga, y se consideró la CIM como la concentración de droga que produjo el 50% de inhibición del crecimiento.

Se tomaron como puntos de corte los valores de CIM propuestos por Rex *et al.* (24). Los aislamientos con CIM para fluconazol \leq 8 µg/ml fueron considerados sensibles (S), con CIM entre 16 y 32 µg/µl sensibles dependientes de la dosis (SDD), y con CIM \geq 64 mg/µl resistentes (R).

Método de difusión en agar

Producción de los discos de papel

Se pesó el equivalente a 25 mg de la droga fluconazol (Pfizer S. A., Argentina) pura (100% de potencia) y se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril. Cada disco de papel Whatman N° 1 (Whatman International Ltd., England) estéril, de 7,25 mm de diámetro, se cargó con 10 ml de la solución (carga final por disco 25 mg). Una vez secos, los discos se envasaron en tubos estériles, de cierre hermético, con silica gel previamente deshidratada. Los tubos se mantuvieron a 4 °C en desecador, y conservaron su calidad durante dos años.

Se efectuó el control de la calidad (uniformidad de la carga, esterilidad y estabilidad) sobre el 10% de los discos producidos por lote. La uniformidad y la estabilidad de carga del disco se evaluaron por el método de difusión en agar, como se describe posteriormente en metodología, utilizando las cepas de referencia. La esterilidad de los discos fue controlada antes y después de cargar la droga.

Procedimiento

A partir de un cultivo de 24 h a 35 °C en agar YM (30), se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril (solución salina 0,85%).

Para el método de difusión se utilizaron placas de Petri de 10 cm de diámetro, con 25 ml de agar Mueller-Hinton (Difco), suplementado con 2% de glucosa (Sigma) y con el agregado de azul de metileno, en una concentración final de 0,5 mg/ml (medio MHm) (2, 14).

La superficie de cada placa de Petri con MHm se hisopó en tres direcciones con el inóculo correspondiente y se dejó secar durante 10 a 15 minutos en estufa, a 36 ± 2 °C. Se colocaron dos discos de fluconazol por placa y luego de una incubación de 24 h (48 h para *C. parapsilosis*) a 36 ± 2 °C, se midió con una regla el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento, en mm. No se tomaron en cuenta las colonias de pequeño o mediano tamaño dentro de la zona de inhibición.

Interpretación de resultados

Para correlacionar los valores de CIM con el diámetro del halo de inhibición obtenido mediante el método de difusión, y poder determinar así los valores de corte de este último método, se realizó un análisis de regresión lineal. Para ello se utilizó el registro de los halos de inhibición y los valores de CIM obtenidos en el laboratorio del Departamento Micología.

Los errores *very major* se calcularon sobre la base del número de cepas que fueron clasificadas como S por el método de difusión y como R por el método de referencia (CIM). Los errores *major* se determinaron por el número de cepas R por el método de difusión y S por el método de referencia. Los errores *minor* se determinaron cuando por uno de los métodos el resultado fue SDD y por el otro S o R.

Para determinar el grado de asociación entre ambos métodos, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r).

Reproducibilidad del método de difusión

Para evaluar la reproducibilidad intralaboratorio, tres profesionales y dos técnicos especializados del Departamento Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" realizaron el método de difusión en 20 oportunidades empleando las cepas de referencia. Los cinco operadores midieron individualmente los halos de inhibición de sus ensayos y registraron los datos.

Para evaluar la reproducibilidad interlaboratorio, el Laboratorio de Micología del Instituto de Salud Carlos III de España, cuatro laboratorios de la Argentina y el Departamento de Micología ya citado compararon por el método de difusión el panel de 59 cepas de referencia para pruebas de sensibilidad del EUCAST (*C. albicans* n=10, *C. parapsilosis* n=10, *C. tropicalis* n=10, *C. lusitanae* n=10, *C. glabrata* n=9, *C. krusei* n= 10) y las dos cepas de referencia ATCC (7). Además, la reproducibilidad se evaluó con los valores de halos de inhibición de las cepas de referencia ATCC obtenidos en los 21 Laboratorios integrantes de la RED WHONET.

RESULTADOS

Del total de 1193 aislamientos estudiados se identificaron las siguientes especies de levaduras: *C. albicans* (n=584), *C. parapsilosis* (n=196), *C. tropicalis* (n=200), *C. glabrata* (n=113), *C. krusei* (n=50), *Saccharomyces cerevisiae* (n=4), *Pichia anomala* (n=3) y otras especies de *Candida* (n= 43).

La CIM de los aislamientos evaluados permitió determinar que el 91,7% (n=1094) eran S a fluconazol, el 6,1% (n=72) SDD y el 2,3% (n=27) R. La correlación de Pearson mostró un valor de $r=0,7682$. Los valores del diámetro de los halos de inhibición (valor de corte del método de difusión), calculados utilizando el análisis de correlación, fueron \geq 16 mm para cepas S, entre 9 y 15 mm para cepas SDD y \leq 8 mm para cepas R (Figura 1).

El método de difusión permitió detectar correctamente más del 96% de los aislamientos S e igual porcentaje de los R por CIM, y un 60% de los SDD. El grado de concordancia entre ambos métodos fue del 94,7%. Dos cepas (0,2%) tuvieron errores *very major*, es decir CIM \geq 64 mg/ml, con un halo de inhibición \geq 16 mm. Cuatro aislamientos (0,3%) mostraron errores *major* (CIM \leq 8 mg/ml y halos de inhibición \leq 8 mm) y 57 aislamientos (4,8%) mostraron errores *minor* (CIM entre 16 y 32 mg/ml y diá-

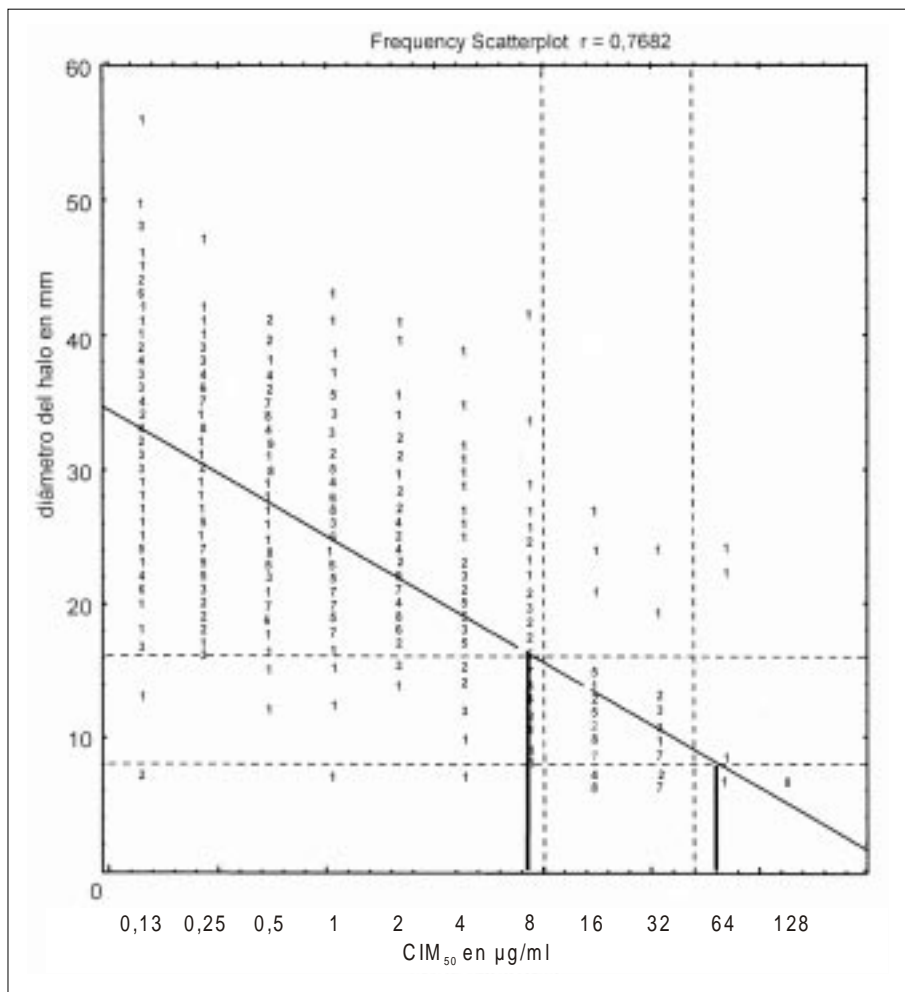


Figura 1. Distribución de los valores de sensibilidad de los 1193 aislamientos de levaduras. Diámetro del halo de inhibición en mm versus los valores de CIM_{50} (mg/ml) obtenidos por el método de microdilución. Los diámetros de los valores de corte fueron calculados para cepas S ($CIM \leq 8$ mg/ml) ≥ 16 mm, para cepas SDD ($CIM = 16$ y 32 mg/ml) entre 9 y 15 mm y para cepas R ($CIM \geq 64$ mg/ml) ≤ 8 mm. El valor de correlación de Pearson calculado fue $r = 0,7682$.

metros de inhibición ≥ 16 o ≤ 8 mm; $CIM \leq 8$ o ≥ 64 mg/ml y diámetros entre 8 y 16 mm) (Tabla 1).

Los errores *very major* se produjeron en dos aislamientos de *C. tropicalis*. Los errores *major* se produjeron en tres aislamientos de *C. albicans* y uno de *C. tropicalis*. Los errores *minor* fueron los más frecuentes y se produjeron en 57 aislamientos del género *Candida*. Las discordancias y concordancias por especie se muestran en la Tabla 1. Especies emergentes, como *C. norvegensis* (n=1), *C. lipolytica* (n=2), *C. pelliculosa* (n=1), *C. lusitaniae* (n=6) y *C. kefyr* (n=8) fueron S a fluconazol por ambos métodos.

De los seis aislamientos de *C. haemulonii*, tres SDD y tres S por CIM, uno fue R y dos fueron SDD por difusión, respectivamente; los resultados de los otros tres fueron coincidentes. De los dos aislamientos de *C. rugosa* S

por CIM, uno fue SDD por difusión en disco. En este estudio, las levaduras de otros géneros diferentes de *Candida* fueron todas S a fluconazol.

Cuando se evaluó la reproducibilidad intralaboratorio, los cinco lectores identificaron unívocamente los aislamientos S, SDD y R por el método de difusión con lectura visual. La discrepancia en la lectura de los halos de inhibición nunca fue mayor de dos milímetros para un mismo aislamiento leído por diferente operador.

En el ensayo de reproducibilidad interlaboratorio, la concordancia global fue de 98% en los resultados para aislamientos S a fluconazol; sólo una cepa de *C. parapsilosis* ($CIM=0,5$ mg/ml) fue informada como SDD por un laboratorio (error *minor*=2%). Los resultados de las cepas R fueron correctos en todos los laboratorios (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados de CIM y método de difusión con discos de 1193 aislamientos de levaduras y porcentajes de concordancia global y por especies, entre ambos métodos.

Aislamiento (n)	Diámetro (mm)	CIM ₅₀											Discordancia (%)			Concordancia (%)		
		0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	Minor	Major	Very major			
<i>Candida albicans</i> (584)	³16	428	82	21	6	6	5	5	1									
	9-15	1			1		1	2	3	2				10 (1,7)	3 (0,5)	0 (0,0)		97,8
	£8	2			1					2	2	9	4					
<i>Candida parapsilosis</i> (196)	³16	19	26	72	46	24	5	1										
	9-15							1	2					1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)		99,5
	£8																	
<i>Candida tropicalis</i> (200)	³16	29	46	67	25	4	4	4	1			2						
	9-15			1		1	3	4	1	2				11 (5,5)	1 (0,5)	2 (1,0)		93,0
	£8						1		1		1	3						
<i>Candida glabrata</i> (113)	³16	10	7	8	21	27	12	7	1	1								
	9-15			1			2	6	4	2				13 (11,5)	0 (0,0)	0 (0,0)		88,5
	£8										2	2						
<i>Candida krusei</i> (50)	³16						1	1										
	9-15							3	18	8	1			17 (34,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		66,0
	£8								9	4	4	1						
<i>Candida</i> spp. y otras levaduras *(50)	³16	3	13	8		3	9	5	1									
	9-15							3	2	2				5 (11,6)	0 (0,0)	0 (0,0)		88,4
	£8										1							
TOTAL DE AISLAMIENTOS (1193)	³16	489	174	176	98	64	36	23	4	1	2			57 (4,8)	4 (0,3)	2 (0,2)		94,7
	9-15	1		2	1	1	6	19	30	16	1							
	£8	2			1		1		12	9	16	8						

* Incluye *Candida famata* (12), *Candida kefyr* (8), *Candida haemulonii* (6), *Candida lusitanae* (6), *Candida guilliermondii* (5), *Pichia anomala* (3), *Saccharomyces cerevisiae* (4), *Candida rugosa* (2), *Candida lipolytica* (2), *Candida norvegensis* (1) y *Candida pelliculosa* (1)

La concordancia de resultados interlaboratorio más baja fue para las cepas SDD estudiadas (nueve *C. krusei* y una *C. glabrata*). En el caso de *C. glabrata*, el aislamiento SDD (CIM=16 mg/ml) del panel fue informado correctamente por dos laboratorios, con un halo £ 12 mm (SDD); los otros cuatro la informaron como S, con un halo de inhibición ³ 20 mm. En *C. krusei*, donde se evaluaron 2 cepas del panel R y 9 SDD, fue donde se observó la mayor discrepancia entre laboratorios, y sólo cuatro cepas (dos R y dos SDD) fueron evaluadas correctamente por el método de difusión. La cepa de referencia, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM=1mg/ml), fue S, con diámetros ³ 25 mm para los seis laboratorios, mientras que *C. krusei* ATCC 6258 (CIM=32 mg/ml) fue determinada como R, con diámetros £ 7 mm en tres laboratorios, y como SDD, con diámetros entre 9 y 10 mm, por los otros tres laboratorios (Tabla 2).

Cuando se evaluó la reproducibilidad del método de difusión entre los 21 laboratorios del estudio, la cepa de referencia *C. parapsilosis*, fue informada como S, con un rango de halos de inhibición entre 18 y 25 mm, y *C. krusei* como SDD, con un rango de halos de inhibición entre 8 y 14 mm.

DISCUSIÓN

Se sabe que, de no mediar un tratamiento adecuado, la mortalidad asociada a la infección fúngica es alta, en comparación con la de los pacientes que recibieron tratamiento específico (25). El uso cada vez más frecuente de drogas azólicas para el tratamiento de infecciones fúngicas oportunistas produjo un cambio en la distribución de las especies de levaduras asociadas a estas infecciones. La aparición de especies resistentes a los antifúngicos originó la necesidad de desarrollar nuevas drogas y metodologías para determinar la sensibilidad *in vitro* a estos antimicrobianos.

Los métodos de referencia son de difícil aplicación en la rutina de los laboratorios hospitalarios. El reciente método de difusión en agar, desarrollado y aprobado por el CLSI (M44-A), evaluado en estudios multicéntricos que recomiendan una lectura automatizada, se hace inaccesible para los laboratorios de países en desarrollo por el alto costo del equipamiento requerido para la lectura de halos (11, 16, 17, 19). Los laboratorios asistenciales de la Argentina demandan un método económico, sencillo, rápido y de resultados confiables, que pueda ser inclui-

Tabla 2. Sensibilidad de las cepas del panel EUCAST y las cepas ATCC utilizadas por los seis laboratorios, determinada por el método de difusión con disco.

Especies	diámetro (mm)	Cepas probadas	INEI Malbrán	L-1	L-2	L-3	L-4	CARLOS III ⁽³⁾
<i>C. albicans</i>	³ 16	n=10	10	10	10	10	10	10
	9 -15 £8							
<i>C. tropicalis</i>	³ 16	n=10	10	10	10	10	10	10
	9 -15 £8							
<i>C. parapsilosis</i>	³ 16	n=11 ⁽¹⁾	11	11	10	11	11	11
	9 -15 £8				1			
<i>C. lusitanae</i>	³ 16	n=10	10	10	10	10	10	10
	9 -15 £8							
<i>C. glabrata</i>	³ 16	n=8	8	9	9	8	9	9
	9 -15 £8	n=1	1			1		
<i>C. krusei</i>	³ 16							
	9 -15 £8	n=9 ⁽²⁾ n=2	9 2	4 7	4 7	3 8	6 5	2 9

¹ Incluye la cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019, S a fluconazol

² Incluye la cepa de *C. krusei* ATCC 6258, SDD a fluconazol

³ Laboratorio de Micología del Instituto de Salud Carlos III, España

do en las prácticas de rutina. Esta solicitud reiterada nos llevó a estandarizar un método de difusión en agar, basado en el documento M44-A pero con lectura visual y discos manufacturados en el laboratorio de Micología del INEI-Malbrán.

Un estudio preliminar, realizado en el laboratorio de Micología del Malbrán, permitió comprobar una buena concordancia entre la CIM y el método de difusión en disco desarrollado (datos no mostrados). Para evaluar el método, se realizó el estudio multicéntrico aquí detallado con los laboratorios de la Red WHONET, entrenados y habituados a realizar la metodología de difusión en disco para antibacterianos. Esto nos permitió determinar los valores de corte y la correlación con los valores de CIM obtenidos por el método de referencia.

Los valores de corte obtenidos para el método desarrollado, como era de esperar, difirieron de los propuestos por el documento M44-A, ya que los discos utilizados fueron manufacturados en el INEI-ANLIS "Dr. C. Malbrán". Los diámetros de los halos fueron menores en las tres categorías; sin embargo, el valor de correlación de este método con el método de microdilución CIM ($r = 0,769$) fue comparable a los obtenidos cuando se evaluaron otros métodos de difusión con el método de referencia M27-A2 (r entre 0,70 y 0,80) (2, 16, 27).

En nuestro estudio, los porcentajes de concordancia global entre el método de difusión y el método de refe-

rencia fueron similares a los encontrados por Pfaller *et al.* (16, 17, 19) en los estudios multicéntricos de ARTEMIS (87,4-93,1%), y a los informados por otros autores que usaron lectura visual (91-97%) (3, 27). La lectura visual de los halos de inhibición resultó rápida y reproducible inter e intralaboratorio. Aunque Pfaller *et al.* (17) enfatizan la importancia de utilizar el sistema de lectura automatizado BIOMIC y el software correspondiente, convertir el valor del halo de inhibición en un valor de CIM permite obtener un dato cuantitativo. Otros autores (10) no recomiendan el BIOMIC para el diagnóstico de rutina ya que no mejora el tiempo de obtención de resultados.

La determinación de valores de CIM por un método de difusión está fuera de los objetivos de nuestro trabajo, ya que lo que queremos es diferenciar aislamientos S de levaduras de una forma sencilla, rápida y accesible. Es importante señalar que en estudios previos realizados con cepas aisladas de pacientes de la Argentina, alrededor de un 2% o menos resultaron R a fluconazol (11, 25), por lo que es de esperar que la mayoría de las cepas de *Candida* aisladas en el país sean S a fluconazol.

Los errores *very major* tuvieron porcentajes similares a los informados por los estudios realizados en el marco del programa ARTEMIS y por Barry *et al.* (3, 19) (*very major* = 0,2-0,4%); y menores a los informados por Ma-

tar *et al.* (13) (*very major* = 3,8%). Los errores *major* en nuestro trabajo fueron bajos (0,3%) en comparación con los detectados por los estudios multicéntricos del programa ARTEMIS (3,3-3,4%), y se aproximaron más a lo encontrado por Barry *et al.* (3) y Matar *et al.* (13), que no tuvieron falsos R por difusión. El grupo de aislamientos SDD, como era previsible, presentó mayor discordancia entre las metodologías; cinco cepas presentaron un halo de inhibición ≥ 16 mm y 21 un halo de inhibición ≤ 8 mm; sin embargo, los errores *minor* también fueron menores que los detectados por el programa ARTEMIS (19) y por Matar *et al.* (13) (5,8-9,1%), pero mayores que los determinados por Barry *et al.* (3).

En lo que se refiere a otros métodos de difusión comerciales, como el Etest, los porcentajes de concordancia fueron similares a los encontrados en el nuestro. El Etest® (AB Biodisk) es una alternativa muy aceptable porque permite conocer el valor de CIM; sin embargo, la metodología es costosa para el sistema de salud argentino (3, 13). El otro método disponible en el mercado, tabletas Neo-Sensitabs™ (Rosco), presenta un número muy elevado de errores *major* (falsos resistentes), por lo que no sería una metodología recomendada para detectar aislamientos sensibles a fluconazol (28, 29).

En este estudio los aislamientos falsos sensibles (error *very major*) correspondieron a *C. tropicalis* (Tabla 1), mientras que Pfaller *et al.* (19) los encontraron en *C. glabrata* (error *very major* = 0,7-0,8%), además de *C. tropicalis* (error *very major* = 0,6%); y Barry *et al.*, en *C. krusei* (3). Las dos cepas de nuestro estudio, S por difusión y R por CIM, mostraron una inhibición parcial del crecimiento (*trailing*) cuando fueron evaluadas por microdilución. Cabe mencionar que la lectura de los halos de inhibición de estas cepas fue de difícil interpretación cuando se utilizaron métodos comerciales, como las tabletas de Rosco y el Etest (datos no publicados), debido al efecto *trailing*.

Los resultados falsos resistentes (error *major*) encontrados en nuestro estudio correspondieron al 0,5% de *C. albicans* (n=3) e igual porcentaje de *C. tropicalis* (n=1), lo que difiere de lo encontrado por Pfaller *et al.* (19), quienes observaron falsa resistencia en todas las especies estudiadas.

Por último, los mayores porcentajes de error *minor* en el estudio aquí presentado fueron para *C. krusei* (34%), en coincidencia con lo detectado por Barry *et al.* (3). El porcentaje de discrepancias en *C. glabrata* fue sólo de un 11,5%, a diferencia de lo informado en el trabajo de Pfaller *et al.* (19), donde la mayoría de estas discrepancias se producía en *C. glabrata* con valores de 27 a 31,3%.

El número de aislamientos con CIM ≤ 8 mg/ml detectados por el método de difusión en disco fue elevado

(n=1060), lo que nos permite concluir que el método de difusión podría ser utilizado como método de tamizado (*screening*) de levaduras S al fluconazol con muy buenos resultados. De acuerdo con los resultados obtenidos, el método desarrollado parecería ser seguro para identificar aislamientos S y R a fluconazol, dada la baja cantidad de falsos S y R detectados. No obstante y teniendo en cuenta que el número total de cepas R fue bajo (n=27; 3,8% del total de aislamientos estudiados), no queremos aseverar la utilidad del método para detectar aislamientos resistentes. Sin embargo, algunos autores, con porcentajes de cepas R similares y aun menores (1,7-4,3%), sugieren que el método serviría para detectar estas cepas. Nosotros coincidimos con lo expuesto por Matar *et al.* (13), quien estudió 7,2% de cepas R y propone que cualquier aislamiento que aparezca como R o SDD debe ser enviado a un centro de referencia para repetir la prueba y determinar la CIM por un método de referencia (3, 19).

La mayoría de las discordancias observadas en la lectura de los halos entre los 6 laboratorios que evaluaron el panel del EUCAST de las cepas R y SDD y las dos cepas ATCC se registraron en las cepas de *C. krusei*. Esto probablemente se debió al crecimiento irregular de esta especie en la superficie del agar, lo que dificultó la determinación exacta del halo de inhibición. Este efecto también suele observarse en el método de microdilución (*trailing*).

Finalmente, es necesario destacar que la experiencia es crítica en cualquier técnica utilizada en la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos. Una cuidadosa atención en los detalles del procedimiento y la interpretación de los diámetros de la zona de inhibición es imprescindible cuando se evalúa la sensibilidad de las levaduras al fluconazol por cualquier metodología de difusión que se utilice (29).

En resumen, la prueba de difusión con disco aquí propuesta brinda resultados similares al método del CLSI M44-A, con un aceptable grado de reproducibilidad intra e interlaboratorios. Los resultados demuestran que este método de difusión es suficientemente seguro para diferenciar levaduras del género *Candida* sensibles al fluconazol y podría ser utilizado en los hospitales por su sencillez y bajo costo, lo que permitiría realizar un monitoreo continuo e iniciar la vigilancia de la aparición de cepas de *Candida* spp. R a fluconazol. La metodología evaluada constituye una alternativa, que no reemplaza al método de referencia para determinación de la CIM propuesto por el CLSI. Los aislamientos SDD y R por difusión (con valores del halo de inhibición ≤ 14 mm) y los provenientes de pacientes con falla de tratamiento y episodios recidivantes deberán evaluarse por el método de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abid-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Piazcowsky H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1122-8.
2. Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis J, Pfaller M, *et al.* Quality control limits for fluconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3410-2.
3. 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.
4. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 525-32.
5. Davel G, Nuñez V, Mancebo G. Método 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.
6. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from emerging infections and epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1298-302.
7. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, *et al.* International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3884-9.
8. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. EUCAST. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E Dis 7.1; 2002. (http://www.escmid.org/sites/index_f.aspx?par=2.4).
9. Feo M. Estudio de las condiciones de formación de las clamidosporas. *Rev Latinoam Microbiol* 1974; 16: 105-10.
10. Geiss HK, Klar UE. Evaluation of the BIOMIC video reader system for routine use in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37: 151-5.
11. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, del Palacio A, *et al.* Global Antifungal Surveillance Group. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5623-32.
12. Lee SC, Fung CP, Lee N, See LC, Huang JS, Tsai CJ, *et al.* Fluconazole disk diffusion test with methylene-blue and glucose-enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1615-7.
13. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1647-51.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline, 2004; M44-A. Wayne, Pa, USA.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2002; M27-A2. Villanova, Pa, USA.
16. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1440-6.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, *et al.* Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5848-59.
18. Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3551-7.
19. Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, *et al.* Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3607-12.
20. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, *et al.* International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY participant group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 19-25.
21. Pfaller MA, Jones RN, Doren GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA, and for the SENTRY participant group. International surveillance of bloodstream infection 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.
22. Pfaller MA, Jones RN, Doren GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, *et al.* Bloodstream infection due to *Candida* species: Sentry antimicrobial surveillance program in North America and Latin America 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 747-51.
23. Rege M, Gentry LO, Garey KW. Risk factors for overall and attributable mortality in hospitalized patients with bloodstream candidemia. 44th Annual ICCAC, 2004, Resumen K-745, Washington DC, USA.
24. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et 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 Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-47.
25. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros C, *et al.* Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 189-95.
26. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1998-2003.
27. Rubio MC, Gil J, De Ocariz IR, Benito R, Rezusta A. Comparison of results obtained by testing with three different agar media and by the NCCLS M27-A method for in vitro testing of fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2665-8.

28. Sandven P. Detection of fluconazole-resistant *Candida* strains by a disc diffusion screening test. J Clin Microbiol 1999; 37: 3856-9.
29. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, ETest, and disk diffusion for application in the routine laboratory. J Clin Microbiol 2002; 40: 918-21.
30. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. En: Kurtzman CP & Fell JW, editors. The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, 1998, p. 77-100.

Recibido: 26/6/06 – Aceptado: 04/9/06