

UTILIDAD DE TRES MÉTODOS POR DIFUSIÓN PARA DETECTAR RESISTENCIA A FLUCONAZOL Y VORICONAZOL EN CANDIDA SPP. DE ORIGEN CLÍNICO

Córdoba S., Vivot W., Isla G., Taverna C., Szusz W., Davel G.

Dto. Micología, INEI, ANLIS "Dr. C. G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, CABA.
scordoba@anlis.gov.ar

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas invasoras en pacientes hospitalizados son causadas en su mayoría, por levaduras del Género *Candida* (3,5). El uso de antifúngicos, principalmente azoles en la profilaxis o en el tratamiento, generó cambios en la epidemiología de las micosis con la aparición de especies menos susceptibles. Ante estos cambios, la determinación de la susceptibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos es prioritaria (3,5). Los métodos de referencia (MR) E.Dis 7.1 del EUCAST (2) y M27-A del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (7), permiten detectar la concentración inhibitoria mínima (CIM) *in vitro* y muestran cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Además, aportan información útil para vigilar la resistencia de *Candida* spp. y son una herramienta confiable para el manejo clínico de los pacientes con infecciones severas. Sin embargo, son onerosos y muy laboriosos para los laboratorios clínicos. Por otra parte, existen técnicas comerciales, asequibles y de simple realización, cuya eficacia es necesario conocer antes de implementar su uso en la rutina diaria.

Objetivos: a-Determinar la susceptibilidad *in vitro* de especies de *Candida* frente fluconazol y voriconazol por el método de referencia E. Def 7.1 y por difusión en agar con Tabletas y Discos cargados con antifúngicos. b-Comparar los resultados y determinar la concordancia entre los métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: se determinó la susceptibilidad *in vitro* a un panel de 200 cepas de *Candida* spp., aisladas de diferentes materiales clínicos (hemocultivo, catéter, biopsia, otros) pertenecientes a la colección de cultivos del Dto. Micología del INEI ANLIS "Dr. C. Malbrán" que ingresaron durante el período 1993-2008, e incluía cepas resistentes (R) y sensibles dependiente de dosis (SSD) a los azoles. Las levaduras fueron identificadas mediante el estudio de las características micromorfológicas, fisiológicas, según el método de Kurtzman (4).

Susceptibilidad *in vitro*: la CIM se determinó según el MR E. Def 7.1, con medio de cultivo RPMI 1640, inóculo $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, incubación 24 h a 35°C, lectura con espectrofotómetro (2). Las pruebas por difusión en agar se determinaron según el MR M44-A2 (CLSI) (6) y se utilizaron Tabletas Neo-Sensitabs TM (Rosco, Dinamarca) (9), Discos Oxoid y Discos Malbrán (9) cargados con fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg).

Antifúngicos: fluconazol (FZ) y voriconazol (VZ) (Pfizer, Argentina).

Interpretación: para las tabletas y los discos Oxoid se consideraron los puntos de corte

propuestos por el fabricante (8,11) según se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Puntos de corte para fluconazol y voriconazol M44-A2 (mm) Método de Referencia (mg/L).

	M44-A2 (mm)			Método de Referencia (mg/L)	
	S	SDD	R	S	R
Fluconazol	19	18-15	14	=8	=64
Voriconazol	17	16-14	13	1	4

S: sensible; SDD: sensible dosis dependiente; R: resistente

Tabla 2. Distribución por categorías de susceptibilidad según el método utilizado

Categoría	CIM		Discos Malbrán	Tabletas Rosco		Discos Oxoid	
	FZ	VZ	FZ	FZ	VZ	FZ	VZ
Susceptibles	179	196	170	152	162	152	162
SDD	12	--	--	8	1	4	1
Resistentes	9	4	11	6	1	8	1
Total	200	200	181	166	164	164	164
Error very mayor			1	2	2	2	2
Error mayor			6	6	0	5	0
Error menor			1	5	1	4	1

SDD: sensible dependiente de dosis; FZ: fluconazol; VZ: voriconazol;

Tabla 3. Porcentaje de concordancia total para cada método con el método de referencia

Discos Malbrán	Discos Oxoid		Tabletas Rosco	
Fluconazol	Fluconazol	Voriconazol	Fluconazol	Voriconazol
91,0	82,0	95,1	78,0	95,1

Para el Disco Malbrán se consideró susceptible a FZ cuando el diámetro del halo fue ≥ 16 mm, los valores menores se consideraron no susceptibles (9).

RESULTADOS

Se estudió la susceptibilidad in vitro de 200 levaduras, incluyendo los controles ATCC *Candida parapsilosis* 22019 y *Candida krusei* 6258.

Las especies fueron: *Candida albicans* n= 77; *C. tropicalis* n=35; *C. parapsilosis* n= 32; *C. glabrata* n=20; *C. dubliniensis* n=6; *C. krusei* n=5; *C. lusitaniae* n= 5; otras n= 20.

En la Tabla 2 se muestra la distribución por categorías de susceptibilidad para los métodos utilizados. En general, los métodos por difusión ensayados identificaron sin inconvenientes a las cepas

susceptibles, aunque se observaron 2 errores very mayor para fluconazol y voriconazol cuando se usaron las Tabletas y los Discos Oxoid.

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de concordancia de cada método por difusión con en método de referencia.

DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* son causa de la mayoría de las infecciones fúngicas invasoras en pacientes hospitalizados (3,10). La elección del tratamiento es decisiva para asegurar la mejor evolución clínica de los pacientes. En este sentido, el conocimiento de los valores de susceptibilidad a los antifúngicos es de utilidad al momento de elegir el tratamiento más eficaz.

Los métodos de referencia E. Dis 7.1 y M27-A3 permiten determinar la CIM

de las cepas de levaduras en estudio, sin embargo, son técnicas sofisticadas, cuya ejecución no está indicada para la rutina diaria (2, 7). Por otra parte, los métodos comerciales, son asequibles y de fácil realización en los laboratorios clínicos, con ellos se pueden obtener resultados fiables y comparables con los estándares. No obstante, los factores técnicos inherentes a los distintos métodos pueden interferir con la interpretación de los resultados, motivo por el que es mandatario compararlos con el método de referencia antes de decidir su implementación (1,8,9).

En nuestro trabajo comparamos los resultados de susceptibilidad *in vitro* obtenidos por tres técnicas de difusión en agar versus el método de referencia. El método por difusión permitió detectar al 94,5; 92,7 y 91,5 % de las cepas susceptibles al fluconazol por Disco Malbrán, Disco Oxoid y Tabletas Neo Sensitabs respectivamente. Mientras que para voriconazol, tanto el Disco Oxoid como las Tabletas Neo Sensitabs identificaron al 98,8% de las cepas susceptibles.

Nuestros resultados coinciden con trabajos de otros autores, en los que hacen referencia de la aparición de errores very major cuando determinan susceptibilidad frente a fluconazol con las tabletas de Neo Sensitabs (1,8,12). Con respecto a la concordancia general, observamos que entre el método de referencia y los métodos por difusión para FZ y VZ fue del 84,4 y 95,1 % respectivamente. Además, los Discos Malbrán y Discos Oxoid fueron más efectivos para detectar *in vitro* a las cepas susceptibles (8,9). La determinación de susceptibilidad por métodos de difusión en agar constituiría una alternativa potencialmente útil para ser utilizados en los laboratorios hospitalarios. Con ellos sería posible distinguir cepas de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos, aunque es necesario realizar los ensayos bajo estricto control de los factores técnicos y por otra parte remitir al laboratorio referente todos las cepas no susceptibles para su confirmación por 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. 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.
3. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009 15;48(12): 1695-703.
4. Kurtzman & Fell; NJW. The yeast, a taxonomic study. Ed. Elsevier Science Publisher B.W., Amsterdam, 1998.
5. Lewis RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin* 2009; 25: 1732-40.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline, (2004) Document M44-A. Wayne, Pa, USA.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.
8. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. (2005) 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*; 43:5848-59.
9. Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfield P, Olguín C, Cuirolo A, Soria M, Guelfand L, Canteros CE, Davel G y participantes de la RED WHONET (2006). Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Rev. Arg. Microb.* 38: 155-163.
10. 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: 189-195.
11. User's Guide NEO-SENSITABS™ Susceptibility testing, 18th Ed. 2005/2006. Rosco Diagnostica A/S.
12. Vandenbossche I, Vanechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility Testing of Fluconazole by the NCCLS Broth Macro-dilution Method, E-Test, and Disk Diffusion for Application in the Routine Laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 918-921.