

Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí»

Estudio comparativo de medición entre lecturas visuales y espectrofotométricas en pruebas de susceptibilidad *in vitro* de aislamientos de *candida*

Comparative study of measure visual and spectrophotometer lectures in a *in vitro* antifungal susceptibility testing in *candida* isolates

Luis Enrique Jerez Puebla¹, Carlos M. Fernández Andreu², María T. Illnait Zarago³, Mayda R. Perurena⁴, Iraida Rodríguez-Gutiérrez⁵, Gerardo Martínez Machín⁶

¹Licenciado en Microbiología. *Master* en Ciencias. Aspirante a Investigador. Instructor. E-mail: ljerezp@ipk.sld.cu

²Licenciado en Microbiología. Doctor en Ciencias de la Salud. Investigador Titular. E-mail: cfandreu@ipk.sld.cu

³Especialista Segundo Grado en Microbiología. Auxiliar. Investigadora Auxiliar. E-mail: zamtilnait@ipk.sld.cu

⁴Licenciada en Microbiología. *Master* en Ciencias. Investigadora Agregada. Auxiliar. E-mail: lanchamrpl@ipk.sld.cu

⁵Técnico en Microbiología.

⁶Especialista Segundo Grado en Microbiología. Auxiliar. Investigador Auxiliar. E-mail: gerardo@ipk.sld.cu

RESUMEN

Se realizó un estudio de susceptibilidad *in vitro* frente a itraconazol, ketoconazol y clotrimazol de 144 cepas de *Candida*, conservadas y previamente identificadas, aisladas de la cavidad oral de pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) con cuadros clínicos de *candidiasis orofaríngea* (COF). El estudio se llevó a cabo mediante dos metodologías; la primera, utilizando los requerimientos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), en el cual está establecida la lectura visual para determinar los patrones de susceptibilidad; y la segunda, mediante la propuesta de la European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing, el cual tiene fijado la lectura espectrofotométrica para eliminar las posibles subjetividades de la metodología del CLSI. Los resultados obtenidos mediante ambas lecturas no mostraron diferencias mayores a dos diluciones en los valores de

concentración mínima inhibitoria, y demostraron que ambos métodos se correlacionan y es importante para aquellos laboratorios de pocos recursos económicos.

Palabras clave: Susceptibilidad *in vitro*; *Candida*, lectura visual, CLSI, lectura espectrofotométrica, EUCAST azoles, VIH/sida.

ABSTRACT

A study of *in vitro* susceptibility was realized opposite to itraconazol, ketoconazol and clotrimazol of 144 strains of *Candida*, conserved and previously identified, isolated of the oral cavity of patients infected by the virus of human immunodeficiency (VIH) with clinical pictures of oropharyngeal candidiasis (COF). The study was realized by means of two methodologies; the first one, using the requests of the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), in which the visual reading is established to determine the patterns of susceptibility; and the second one, by means of the proposal of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing, which has fixed the spectrophotometric to eliminate the possible subjectivities of the methodology of the CLSI. The results obtained by means of both readings did not show differences bigger than two dilutions in the values of minimal inhibitory concentration, demonstrating that both methods are correlated and it is important for those laboratories of few economic resources.

Key words: *in vitro* susceptibility testing, *Candida*, visual lecture, CLSI, spectrophotometric lecture, EUCAST, azoles, HIV/aids.

INTRODUCCIÓN

En la década de 1980, varias sociedades microbiológicas y grupos de investigadores de diversos países empezaron a interesarse por el desarrollo de técnicas para realizar estudios de susceptibilidad a los antifúngicos. Este interés se vio plasmado en trabajos multicéntricos que sirvieron para establecer métodos de referencia para tales estudios.¹ La mayoría de los métodos emplean técnicas de dilución en medio líquido y se basan en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la determinación de porcentajes de inhibición, en relación con un control de crecimiento.²

Dentro de los métodos de referencia destacan los recomendados por el CLSI (del inglés, Clinical and Laboratory Standards Institute), anteriormente llamado NCCLS (del inglés, National Committee for Clinical Laboratory Standards). Esta institución ha desarrollado y publicado un método de referencia admitido para las pruebas de microdilución en medio líquido para especies de *Candida* (documento M27-A2) para determinar la susceptibilidad a varios agentes antimicóticos.² Estas normas son las más difundidas y utilizadas para estudios de correlación con la clínica.^{3, 4} Por otra parte, también se ha desarrollado un estándar europeo, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) del European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST), que ha demostrado ser equivalente al publicado

por el CLSI para levaduras no fermentadoras, constituyendo una metodología alternativa.⁵ Estos metodologías de referencia que utilizan el método de dilución en caldo constituyen las pruebas de referencia para determinar la susceptibilidad *in vitro* tanto de levaduras como de hongos filamentosos.^{6,7}

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos ofrecen la posibilidad de obtener datos relativamente fiables a la hora de seleccionar el fármaco más adecuado para el tratamiento de las infecciones fúngicas. Esto permite una valoración cuantitativa de la CMI característica de un aislamiento clínico frente a los antifúngicos estudiados y de forma cualitativa su resistencia o sensibilidad a estas sustancias. La utilidad de esta radica en la predicción de la respuesta clínica y la explicación de los fallos terapéuticos.^{1,7}

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar los resultados de la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Candida* frente a tres derivados azólicos mediante las dos normativas vigentes que utilizan la técnica de microdilución en caldo para tales pruebas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas estudiadas: Se estudiaron 144 aislamientos de *Candida* previamente identificados mediante el sistema API 20C (bioMérieux, Inc, Hazelwood, Mo.) distribuyéndose en 132 cepas de *Candida albicans*, 2 cepas de *C. tropicalis*, *Candida sp.*, *C. lusitanae*, *C. parapsilopsis*, y una de *Candida famata*, *C. utilis*, *C. glabrata*, y *C. guilliermondii*.

Antifúngicos: Se ensayaron tres antifúngicos: itraconazol, ketoconazol y clotrimazol, los cuales fueron proporcionados directamente por laboratorios productores (SIGMA I6657, SIGMA K1003, y SIGMA C2812, respectivamente) en forma de polvo con una potencia de 100%.

Prueba de Susceptibilidad *in vitro*: Las CMI de los tres derivados azólicos fueron determinadas siguiendo el método de microdilución en medio líquido del documento M27- A2 del CLSI y la metodología propuesta por el EUCAST. Las concentraciones probadas de los antifúngicos ensayados estuvieron comprendidas entre 0.01 y 8 ig/mL.

Se utilizaron las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controles de la calidad.

La lectura de los resultados se realizó visualmente (recomendada por el documento M27-A2) y espectrofotométricamente (Reader 230S, Organon Técnica); se llevó a cabo esta última a 405 nm, utilizando para la determinación de 50 % de inhibición del crecimiento las fórmulas siguientes:⁸

Donde: A: Absorbancia.

$$A \leq A_b + [0,5 \times (A_k - A_b)]$$

$$A \leq A_b + [0,1 \times (A_k - A_b)]$$

Ab: Absorbancia del blanco (control sin inóculo y sin droga).

Ak: Absorbancia del control de crecimiento.

La lectura visual se realizó con la ayuda de un visor de aumento (Gallenkamp, CNW-325), definiéndose la CMI como la concentración más baja de antifúngico que inhibió 50 % crecimiento de la levadura, al compararla con el control de crecimiento.

Análisis estadístico

Utilizando el programa estadístico EpiInfo versión 5.01, se establecieron los rangos de la CMI y la correlación entre las lecturas visuales y espectrofotométricas mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r).

RESULTADOS

La CMI para el cual 50 % de los aislamientos fueron inhibidos, mostró una diferencia no mayor de dos diluciones en las cepas estudiadas frente a los azoles evaluados. Es de destacar que para el clotrimazol y el ketoconazol hubo una similitud de resultados superior a 94%, corroborando la correlación que existe entre ambos métodos. Aún cuando se notó una mayor diferencia en los resultados obtenidos frente al itraconazol, estos quedaron en el rango de dos diluciones

Los valores de rango y medias geométricas de la CMI de los tres derivados azólicos de los aislamientos son reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los valores de CMI (µg/mL) de los azoles en las especies de *Candida* estudiadas según lectura realizada.

Especies aisladas (n)	Itraconazol		Ketoconazol		Clotrimazol	
	L.V Rango CMI (µg/mL)	L.E Rango CMI (µg/mL)	L.V Rango CMI (µg/mL)	L.E Rango CMI (µg/mL)	L.V Rango CMI (µg/mL)	L.E Rango CMI (µg/mL)
<i>C. albicans</i> (132)	0.01-8	0.01-4	0.01-8	0.01-8	0.01-2	0.01-2
<i>C. lusitaniae</i> (2)	0.01-0.125	0.01-0.06	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>Candida sp</i> (2)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01-0.06	0.01-0.06
<i>C. tropicalis</i> (2)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>C. parapsilosis</i> (2)	0.01-0.03	0.01-0.03	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>C. guilliermondii</i> (1)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03
<i>C. glabrata</i> (1)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01
<i>C. utilis</i> (1)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>C. famata</i> (1)	0.01	0.01	8	8	0.01	0.01

Leyenda: L.V: lectura visual

L.E: Lectura espectrofotométrica

Al realizar el análisis de correlación entre los datos obtenidos por ambas lecturas mediante el coeficiente de correlación de Pearson se evidenció que el clotrimazol y el ketoconazol alcanzaron los mayores índices de concordancia ($r = 0,96$ y $r = 0,94$, respectivamente), siendo el itraconazol el fármaco que menor concordancia obtuvo entre ambas lecturas realizadas, con una $r = 0,63$, como se muestra en la Figura 1.

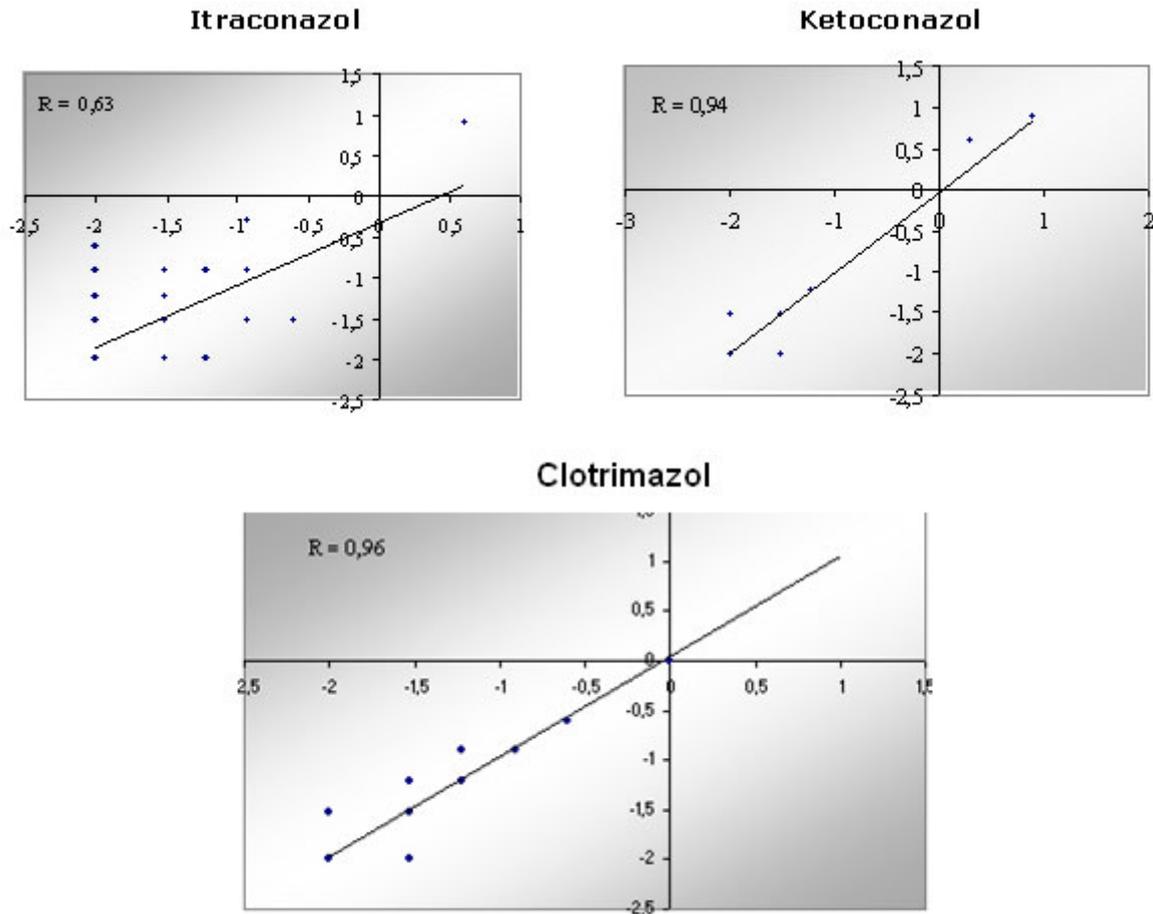


Figura 1. Coeficiente de correlación de Pearson entre las lecturas visuales y espectrofotométrica.

DISCUSIÓN

Debido al aumento en las infecciones fúngicas invasoras y a la emergencia de hongos resistentes a los antifúngicos, ha sido necesario desarrollar métodos estandarizados de susceptibilidad antifúngica. En la actualidad, se disponen de dos normativas que utilizan el método de microdilución en caldo. Uno es el documento M27-A2, de la CLSI, en el cual se han establecido puntos de cortes después de una exhaustiva correlación clínica y epidemiológica para determinar la susceptibilidad *in vitro*, a determinados antifúngicos como los azoles.⁶ Se han establecido puntos de cortes de CMI para fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B y flucitosina.

El otro estándar europeo EUCAST-AFST, cuya versión definitiva se publicó en el año 2007 y que ha establecido puntos de cortes clínicos de acuerdo con la especie y la relación entre criterios farmacodinámicos y la distribución de la CIM. Es por ello que se han establecido que hay especies con puntos de corte relacionados y no relacionados para el fluconazol y el voriconazol.^{9, 10}

Aunque ambos estándares son similares, presentan diferencias en varios aspectos de la metodología para evaluar susceptibilidad de levaduras fermentadoras como *Candida* sp.^{6,9,11}

Algunas de las diferencias más importantes son: el tiempo de incubación (24 horas para EUCAST y 48 horas para el estándar CLSI), pues el primero utiliza un inóculo mayor; el fondo de los pocillos de las placas de microtitulación (plano para EUCAST y redondo para CLSI); la lectura (espectrofotométrica en EUCAST, visual en CLSI). Ambos utilizan RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y una concentración de glucosa de 0,2 y 2% (CLSI y EUCAST, respectivamente).

Aunque ambos estándares correlacionan bastante bien dentro de tres diluciones; el método EUCAST, tendería a leer CMI más bajas que el método CLSI, por lo que es recomendable leer cada estándar con sus propios puntos de corte. Desde el punto de vista práctico, el método del EUCAST es menos laborioso, más fácil de interpretar, sobre todo, en cepas que tienen un crecimiento residual por encima de su CMI, y arroja resultados definitivos a las 24 horas de incubación.

El documento M27-A2 del CLSI, especifica realizar la lectura visual del punto final de la CMI después de las 48 horas de incubación, lo cual fue derivado a partir del trabajo de Espinel-Ingroff *et al.*¹²

Con los agentes fungicidas, como la anfotericina B, el crecimiento cesa con la exposición del antifúngico, y resulta en un punto final de corte evidente. Sin embargo, con los agentes fungistáticos, como los azoles, el inicio de la acción del fármaco es retardado, y esta resulta en un crecimiento limitado, pero persistente, por encima del rango de concentraciones superiores al de la CMI, por lo que es, en ocasiones, difícil determinar el valor del corte final.¹³ Este crecimiento, denominado «cola de crecimiento», se presenta generalmente en cepas de *C. albicans* y *C. tropicales*.^{14,15}

La lectura espectrofotométrica de las pruebas de microdilución en medio líquido con agentes antifúngicos azólicos proporciona una medida más objetiva de crecimiento fúngico y elimina el juicio subjetivo que pueda encontrarse con la lectura visual del valor final de la CMI¹³, por lo que algunos autores la recomiendan para realizar la lectura en estas pruebas.¹⁶

Hay reportado en la literatura internacional un trabajo multicéntrico que compara la susceptibilidad *in vitro* de *Candida* al itraconazol, fluconazol y voriconazol mediante los dos métodos de referencia, del CLSI y del EUCAST. En este trabajo, se obtuvo una menor concordancia entre las CMI para el itraconazol,¹⁷ aunque estas diferencias no fueron mayores de tres diluciones, resultando este semejante a lo reportado en nuestro estudio.

Pese a que se evaluaron antifúngicos que no están contemplados en los puntos de cortes de ambas metodologías, estos sí son de uso cotidiano en Cuba para el tratamiento de micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas. Es por ello, que nos dimos a la tarea de comparar los resultados arrojados y analizar las diferencias que pudieran existir al respecto. Este estudio permite comprobar la correlación existente entre los dos métodos de referencia, y es de gran utilidad para aquellos laboratorios de pocos recursos económicos que no puedan contar con un espectrofotómetro para realizar la lectura de los resultados.

Se hace necesario por tanto, continuar con estos estudios para estandarizar los puntos de cortes, en ambas metodologías, para aquellos antifúngicos que no lo

presentan, y de esa forma contar con una vigilancia de la resistencia a los antimicóticos que se utilizan en la práctica clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cuesta I, Bielza C, Cuenca-Estrella M, Larrañaga P, Rodríguez-Tudela JL. Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and comparison with those of the european committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Apr; 54(4):1541-6.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. NCCLS document M27 A2. NCCLS, Wayne, PA. 2002.
3. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents *in vitro*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8(3):267-76.
4. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48: 153-160.
5. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 398-405.
6. Arisan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-87.
7. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 Suppl 1: 113-8.
8. Serefko A, Los R, Biernasiuk A, Malm A. Comparison of microdilution method and E-test procedure in susceptibility testing of caspofungin against *Candida non-albicans* species. *New Microbiol*. 2008; 31(2):257-62.
9. EUCAST clinical MIC breakpoints 2008-07-24 (v 2.0) <http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>. (Accedido 11 noviembre 2008).
10. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 398-405.
11. Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, *et al*. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 109-11.

12. Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses*. 2010; 53(1):1-11.
13. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Pfaller MA, Rinaldi M. Fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing strains of *Candida*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 46(8):247781.
14. Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27(2):127-31.
15. Coenye T, De Vos M, Vandebosch D, Nelis H. Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(5):495-7.
16. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5):1592-9.
17. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL. 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(8): 388489.

Recibido: 30 de junio de 2010.

Aprobado: 8 de Abril de 2011.