



## Evaluación del método comercial ATB FUNGUS 3 frente al método de referencia M27- A2, para determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* a diferentes antifúngicos

Evaluation of the commercial method ATB FUNGUS 3 against the reference method M27-A2, to determine the susceptibility of *Candida albicans* to different antifungals

CALDERON, RAQUEL

VARGAS, SANDRA

FECHA DE RECEPCIÓN: 12 ABRIL 2021

FECHA DE ACEPTACIÓN: 12 JUNIO DE 2021

### Resumen

**Introducción:** El aumento de la incidencia de las micosis ha generado la necesidad de desarrollar técnicas in vitro para el estudio de la susceptibilidad a los antifúngicos; El documento CLSI M27-A2 es el método de referencia para estudios de sensibilidad en levaduras. No obstante, este no subsana las necesidades de rutina de los laboratorios, principalmente por ser laboriosos; en consecuencia, métodos alternativos surgen ante la necesidad de contar con técnicas más sencillas, una de ellos es el ATB FUNGUS 3 que permite determinar la sensibilidad de *Candida* frente a diferentes antifúngicos.

**Objetivo:** Validar el método comercial ATB FUNGUS 3, frente al método de referencia M27-A2, con el fin de conocer su valor diagnóstico

**Material y métodos:** Se determinó la eficacia del método a través de parámetros de

### Abstract

**Introduction:** The higher incidence of mycoses has generated the need to develop in vitro techniques for susceptibility study to antifungal agents. CLSI M27-A2 is a reference method for yeast susceptibility studies. However, this method does not meet the needs of routine laboratories because it is difficult to follow all the processes. Consequently, alternative methods arise due to the need for simpler techniques. Then, one of them is ATB FUNGUS 3 which allows determining *Candida*'s sensitivity to different antifungal agents.

**Objective:** Validate the commercial method ATB FUNGUS 3 compared with the reference method M27-A2 in order to know its diagnostic value.

**Material and Methods:** Efficacy was determined by diagnostic test parameters. Moreover, sensitivity of 50 strains of *Candida albicans* at Flu-

RAQUEL CALDERON MORALES, LABORATORIO BACTERIOLOGÍA, INSTITUTO SELADIS, FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS, UMSA, LA PAZ, BOLIVIA. ORCID: [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-6862-4467](https://orcid.org/0000-0001-6862-4467)

\*SANDRA GRISEL VARGAS NATTEZ LABORATORIO BACTERIOLOGÍA CLÍNICA, HOSPITAL DEL NORTE, SEDES, LA PAZ, BOLIVIA. CORREO GRIS66SAMY@GMAIL.COM, ORCID: [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0003-1756-4921](https://orcid.org/0000-0003-1756-4921)

test diagnóstico; además, se evaluó la sensibilidad de 50 cepas de *Candida albicans* frente a Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITZ) mediante el método comercial y el de referencia.

Resultados: Se encontró que el ATB - FUNGUS 3 presenta una especificidad para FLZ de 100 %, sensibilidad de 91%, valor predictivo positivo (VPP) de 56%, valor predictivo negativo (VPN) de 100%, con una eficacia diagnóstica de 92%, calculados para un intervalo de confianza (IC) de 95%; para ITZ la especificidad y sensibilidad fue de 88 % y 90% respectivamente, con un VPP de 64%, un VPN de 97%, eficacia diagnóstica de 90%, IC 95%. Para las pruebas de concordancia, el índice Kappa para FLZ e ITZ fue de 0,67 y 0,68 respectivamente. La prueba de Likelihood ratio para el FLZ fue (LR+) de 11,25 mientras que el (LR-) fue 0; para el ITZ (LR+) de 9,19 y el (LR-) fue 0,14. Reproducibilidad de 90 % (FLZ) y 85% (ITZ).

Conclusiones: El ATB FUNGUS 3, es una técnica rápida, de fácil realización y reproducible; pero el desempeño global de la técnica, sugiere que aún no es confiable para el diagnóstico en laboratorios, debido a los valores bajos obtenidos en los VPP, que indican que se podría derivar en errores al momento de determinar una cepa como sensible o resistente, punto importante al momento de decidir la conducta terapéutica.

conazole (FLZ) and Itraconazole (ITZ) was evaluated by the commercial and reference methods.

Results: ATB - FUNGUS 3 presents a specificity for FLZ of 100%, sensitivity of 91%, positive predictive value (PPV) 56%, negative predictive value (NPV) 100% with a diagnostic efficacy of 92 %, calculated for a 95% confidence interval (CI). For ITZ, the specificity and sensitivity were 88% and 90% respectively, with a PPV 64%, a NPV 97% with a diagnostic efficacy of 90%, 95% CI. For the concordance tests, the Kappa index for FLZ and ITZ was 0.67 and 0.68 respectively. The Likelihood ratio test for FLZ was (LR +) of 11.25 while the (LR-) was 0; for ITZ (LR +) of 9.19 and the (LR-) was 0.14. Reproducibility of 90% (FLZ) and 85% (ITZ).

Conclusions: The ATB FUNGUS 3 is a fast, easy and reproducible technique. However the overall performance of the technique suggests that this method hasn't been reliable for diagnostic laboratories yet, because PPVs obtained low values. These PPVs indicate that it could lead to errors when determining a strain as sensitive or resistant. This is an important point when deciding the therapeutic conduct.

#### PALABRAS CLAVE

CANDIDA ALBICANS, ANTIFUNGI-COS, ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD, MÉTODO DE REFERENCIA M27-A2, TEST DIAGNÓSTICO.

#### KEY WORDS

CANDIDA ALBICANS, ANTIFUNGALS, SUSCEPTIBILITY STUDIES, REFERENCE METHOD M27-A2, DIAGNOSTIC TEST.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha ocurrido un aumento continuo en el número de infecciones producidas por hongos. En el año 1950 el aislamiento de estos agentes en la sangre era reportado como un suceso raro y la mayoría de las infecciones diseminadas eran producidas por una cantidad limitada de especies (Galván & Mariscal,2006). Este aumento en la prevalencia de las micosis hizo necesario desarrollar fármacos para su tratamiento.

Sin embargo, como resultado de estas alternativas se han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de cepas que han



desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca (Rodríguez & Cuenca 2012).

Por otra parte si bien *Candida albicans* sigue siendo la causa más común de candidemia, aproximadamente 35% de las candidiasis sistémicas han sido remplazadas por otras especies “no *albicans*”, reportándose una emergencia, debido a que generan dificultades terapéuticas, emergiendo con ellas nuevos patrones de sensibilidad a los antifúngicos (Ghannoum & Rice 2009), por ejemplo: *C. krusei*, *C. glabrata* tienen resistencia intrínseca al fluconazol; por otro lado *C. guilliermondi*, *C. lusitaniae* y *C. parasilopsis* desarrollan resistencia secundaria al fluconazol, actualmente también se han reportado cepas de *C. glabrata* y *C. tropicalis* resistentes a la anfotericina (B P, D. S. 2018).

Frente a estos hechos nace la importancia de conocer el perfil de sensibilidad a los antifúngicos y la necesidad de desarrollar métodos estandarizados para evaluar las correlaciones de la eficacia de la droga in vivo versus in vitro. En los últimos años se han desarrollado técnicas para el estudio de la susceptibilidad in vitro a los antifúngicos, de las cuales el método de microdilución en caldo es considerado de referencia para dicho fin. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (hoy en día CLSI) aprobó un primer estándar, para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos en levaduras en el año 1999 (documento M27-A), modificándolo posteriormente y aprobando en el año 2003 el estándar vigente (documento M27-A2) (Bertout Et.al.,2011). No obstante a pesar de existir este y otros documentos que estandarizan los métodos de estudio de sensibilidad “in vitro” de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica, principalmente por ser un tanto laboriosos, como respuesta a esta necesidad, han surgido métodos alternativos más sencillos y que pueden ser utilizados para diagnóstico diario en el laboratorio clínico; una de ellas es la galería de ATB-FUNGUS 3 que permite determinar la sensibilidad de *Candida* frente a diferentes antifúngicos en medio semisólido en condiciones muy próximas a las de la técnica de referencia de microdilución, a ello se suma la fácil y rápida manipulación e interpretación de resultados. Sin embargo, numerosos trabajos han evaluado diversas metodologías, mostrando resultados controvertidos en relación con la técnica de referencia.

Con la finalidad de responder a las necesidades de nuestros usuarios (pacientes y médicos), el laboratorio de Bacteriología clínica del instituto SELADIS-FCFB-UMSA se ha propuesto desarrollar métodos estandarizados en las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos que nos permita proveer buena concordancia entre los laboratorios y evaluar las correlaciones de la eficacia



de la droga in vivo versus in vitro, para de esta forma evitar posibles resistencias.

Por lo antes descrito, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo validar el método comercial ATB FUNGUS 3, frente al método de referencia M27-A2, para determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* a diferentes antifúngicos. En primera instancia se realizó la estandarización de la técnica de "M27 – A2" (método de referencia), para posteriormente utilizar éste como Gold estándar, en la validación del método comercial "ATB-FUNGUS 3"; Los resultados obtenidos permitirían establecer la eficacia diagnóstica del método comercial, para su posterior implementación dentro del laboratorio de Bacteriología clínica del Instituto SELADIS, como una alternativa del diagnóstico y determinación de CIM para las especies de *Candida*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

La población estuvo constituida por cepas de *C. albicans* obtenidas de muestras de diferente naturaleza, mismas que fueron procesadas en el laboratorio de bacteriología del Instituto SELADIS.

Para el control de calidad se utilizó una cepa control recomendada por la CLSI, *C. parapsilosis* ATCC 22019; ésta es una cepa que ha mostrado tener estabilidad genética y para la que la CIM se ha determinado repetidamente.

### METODO 1. MICRODILUCIÓN EN CALDO M27-A2 (CLSI)

El documento CLSI M27-A2 (2002), es un "ESTÁNDAR DE REFERENCIA" desarrollado a través de un proceso de consenso, para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Un objetivo primordial de un estándar de referencia es sentar las bases de forma que se puedan desarrollar otros métodos más accesibles pero que obtengan resultados similares al estándar.

#### A. Estandarización de la técnica de microdilución planteado por la CLSI.

1. Preparación del medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma). Este medio fue tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (ICN, Sigma), en una concentración final 0,164 M y ajustado a pH  $7\pm 0,1$ .

2. Preparación de la solución madre de antifúngicos, Las soluciones madre de los antifúngicos se prepararon con sustancia pura de cada antimicótico a una concentración 100 veces superior a la concentración mayor ensayada.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que varios antifúngicos tienen una solubilidad limitada o nula en agua, por lo que también se utilizó el dimetil

sulfóxido (DMSO), para los antifúngicos insolubles en agua.

a) Antifúngicos solubles en agua (Fluconazol)

Se preparó el antifúngico a una concentración de 6400 µg/mL, vale decir 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar 64 µg/mL y se disolvió en agua destilada estéril. Luego de filtrar se repartió en alícuotas de 1,1 mL en tubos eppendorf y se congeló a - 40 °C hasta el día de su utilización.

b) Antifúngicos insolubles en agua (Ketoconazol, Itraconazol)

Se pesó la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1600 µg/mL (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolvió en (DMSO). Luego de filtrar se repartió en alícuotas de 1,1 mL en tubos eppendorf y se congeló a - 40 °C hasta el día de su utilización

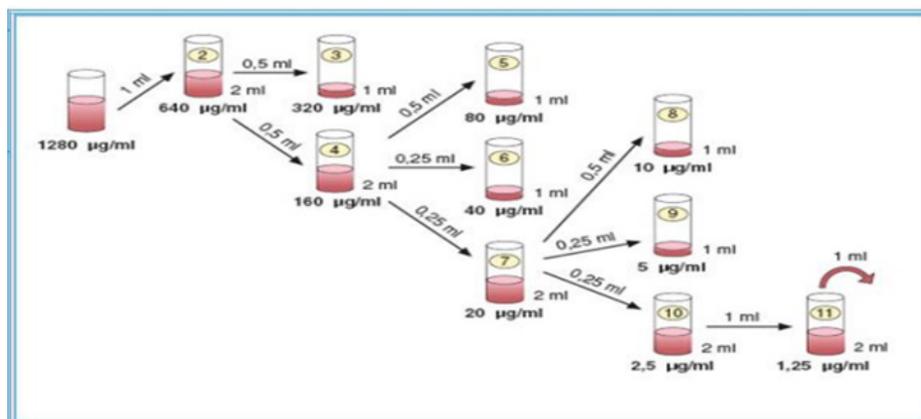
3. Preparación de las diluciones del antifúngico

Para este paso se realizaron diluciones dobles aditivas. Los pasos a seguir fueron diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

a) Antifúngicos solubles en agua (Fluconazol)

A partir de la solución madre se prepararon una serie de diluciones, utilizando como diluyente RPMI 1640, como se describe en el siguiente esquema (figura 1).

**Figura 1: Esquema de diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640**



Luego que todos los tubos contienen 1 mL, con una concentración 10 veces superior a la concentración deseada, se procedió a realizar una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 mL de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos fue 2 veces mayor que la concentración final deseada.

da (de 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (figura 2).

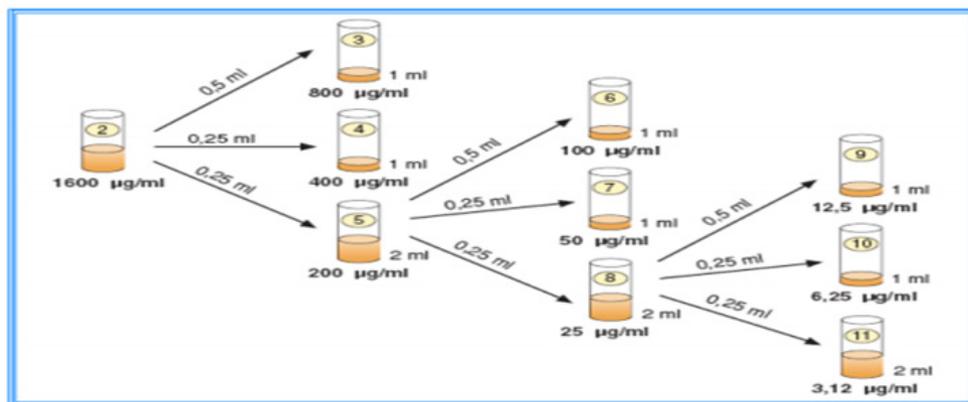
**Figura 2: Esquema de diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640.**



b) Antifúngicos insolubles en agua (Ketoconazol, Itraconazol)

A partir de la solución madre se prepararon una serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO, como se describe en el siguiente esquema (figura 3)

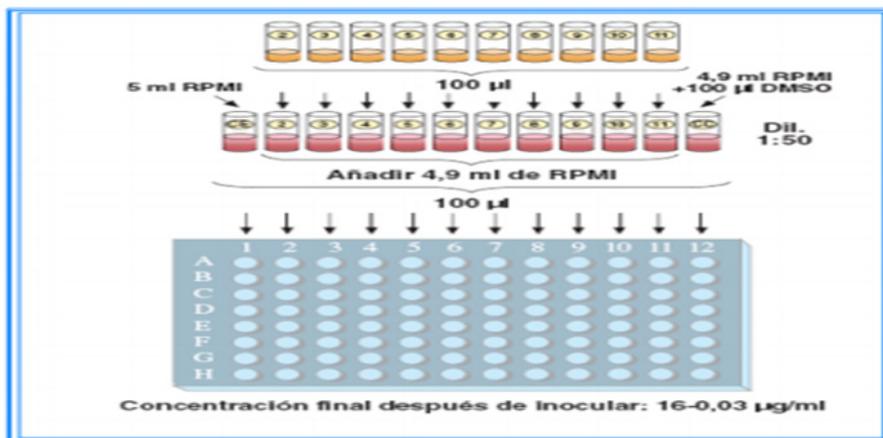
**Figura 3: Esquema de diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente (DMSO).**



Seguidamente se realizó una dilución 1/50 tomando 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo que se transfirieron a otro tubo que contenía 4,9 mL de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico fue dos veces mayor que la concentración final deseada (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - 0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y la de DMSO, 2% Diluyente RPMI

1640. (Figura 4).

**Figura 4: Esquema de diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente (DMSO).**



Para el llenado de las placas, el contenido de cada tubo se puso en una cubeta y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales), se procedió al llenado de las microplacas estériles de 96 pocillos, vertiendo en cada pocillo 100 µl de solución de antifúngico, de la siguiente manera:

Desde la columna nº 2 a la nº 11, se llenaron los pocillos con las diferentes concentraciones de antifúngico (Tabla 1).

La columna nº 1 se llenó con el control de esterilidad (200 uL de RPMI).

La columna nº 12 se llenó con el control de crecimiento (100 uL de RPMI); en el caso de antifúngicos insolubles en agua, la columna nº 12 se relleno con 100 µL de RPMI al 2% con DMSO, ésto con el fin de descartar al DMSO como interferente de crecimiento. Una vez llenas las placas, se cerraron y envolvieron con una bolsa de plástico, para evitar la evaporación, posteriormente se congelaron a - 40 °C.

**Figura 4: Esquema de diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente (DMSO).**

Antifúngico	Concentraciones (ug/ml) utilizadas para el test de microdilución en caldo (CLSI)									
Fluconazol	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Itraconazol	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Ketoconazol	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03



## 4. Preparación del inóculo de las muestras en estudio

Para la preparación del inóculo, todas las muestras incluida la cepa control se subcultivaron en agar Sabouraud glucosado 2%. - El inóculo se preparó tomando 3 colonias del cultivo de 24 hrs, q fueron suspendidas en 5 ml de solución salina estéril al 0,85%, se determinó la absorbancia a 530 nm, en espectrofotómetro, de modo que el inóculo diera un valor entre 0,13 y 0,14 de densidad óptica que es equivalente al patrón de turbidez 0,5 de la escala de Mc Farland. Este ajuste produjo una solución salina que contiene entre  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. Es importante considerar que si bien el método original plantea hacer una dilución 1:1000 del inóculo ajustado, en la práctica se obtuvieron mejores resultados realizando una dilución 1:20 con RPMI 1640. Este ajuste produce una solución más concentrada ya que contiene  $1 - 1,5 \times 10^4$  UFC/mL, esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas del antifúngico.

La columna n° 1 que contenía 200  $\mu$ L de RPMI, se utilizò para el control de esterilidad del medio.

Las columnas n° 2 a 12 contenían 100  $\mu$ L de la suspensión de cepas de levadura en estudio

La columna n° 12 no contenía antifúngico, pero tuvo la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico (100  $\mu$ l RPMI), este pozo fue el control de crecimiento.

Luego de inocular las placas, estas se llevaron a un agitador por 15 minutos, luego se incubaron a 35°C durante 24 horas en atmósfera normal; tras este periodo se procedió a leer los resultados.

**TABLA 2. Intervalo de la CIM de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A2.**

Antifúngico	C. parapsilosis ATCC 22019	
	24 h	48 h
Fluconazol	0,5 - 4 $\mu$ g/mL	1,0 - 4 $\mu$ g/mL
Ketoconazol	0,12 - 0,5 $\mu$ g/mL	0,06 - 0,5 $\mu$ g/mL
Itraconazol	0,12 - 0,5 $\mu$ g/mL	0,06 - 0,5 $\mu$ g/mL

## MÈTODO 2. KIT COMERCIAL (ATB FUNGUS 3)

La galería ATB FUNGUS 3 comercializada por biomérieux, permite determinar la sensibilidad de *Candida* y *Cryptococcus neoformans* frente a antifúngicos en medio semisólido en condiciones muy próximas a la de la técnica



de referencia de microdilución, según recomendaciones de la CLSI. Contiene 16 pares de cápsulas, el primer par sin antifúngico, sirve de control de crecimiento y las 15 cápsulas siguientes contienen 5 antifúngicos a varias concentraciones. La levadura a analizar es puesta en suspensión después se transfiere al medio de cultivo y se inocula en la galería. Después de incubar, la lectura del crecimiento se hace de forma visual. El resultado obtenido permite una CIM para: Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FCA), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VRC) y/o categorizar la cepa en Sensible, Intermedia o resistente para la 5-fluorocitocina (5FC). Cabe destacar que, por razones de factibilidad de sustancia pura, en el estudio de test diagnóstico sólo se tomaron en cuenta 2 de los 5 antimicóticos: el fluconazol con rangos de 0,25 a 128 mg/L, e itraconazol, con rangos de 0,125 a 4 mg/L.

Para la lectura de los resultados se siguió los siguientes pasos: Se verificó la presencia de un crecimiento suficiente en la cúpula testigo. Para cepas de Candida se consideró la incubación de 48 hrs si el crecimiento era insuficiente. La ausencia de crecimiento en uno de los dos pocillos control invalidaba la prueba y debía ser repetida. - Para la determinación del CIM, se leyeron los resultados sobre un fondo negro, la lectura se realizó a partir de la concentración más baja y se anotaron los resultados sobre la ficha de resultados de crecimiento para cada una de las cúpulas comparando con las cúpulas testigo (Tabla 4).

**TABLA 4. Puntuación asignada para la lectura de turbidez para el método ATB FUNGUS 3**

DEFINICIÓN	ATB FUNGUS	VALORACIÓN
Ausencia de reducción de crecimiento		4
Ligera reducción de crecimiento		3
Marcada reducción del crecimiento		2
Crecimiento muy debil		1
Ausencia de crecimiento		0

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### 1. Evaluación del desempeño diagnóstico del ATB- FUNGUS 3

De las 50 muestras procesadas, se realizó el estudio diagnóstico y el estudio de correlación sólo para dos antifúngicos, esto debido principalmente a la falta de disponibilidad de sustancia pura de antifúngico en el mercado de nuestro país, los cuales eran necesarios para el desarrollo del método de referencia M27-A2. En las Tablas 5 y 6 se presentan los datos correspondientes para la construcción de la tabla de 2 X 2, tanto para el Fluconazol como para el Itraconazol, en donde se muestran los valores de: VP, VN, FP y FN.



Dentro del presente trabajo, además de las bacterias del género *Pseudomonas*, también se investigó la presencia de bacterias del género *Staphylococcus*, obteniéndose valores en el recuento de este género bacteriano entre 0 y  $7,8 \times 10$  UFC/mL, con un valor promedio para el agua del lago de  $3,8 \times 10$  UFC/mL (Ver Tabla 1).

**TABLA 5.** Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Fluconazol (N = 50).

**Tabla 2x2 para el FLUCONAZOL**

Método de referencia	Metodo probado		TOTAL
	R (ATB-F)	S ( ATB-F )	
R ( CLSI )	5	4	9 *
S ( CLSI )	0	41	41
TOTAL	5	48	50

\*Sensible dosis dependiente SDD; R: Resistente; S: Sensible

**TABLA 6.** Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Itraconazol (N = 50).

**Tabla 2x2 para el ITRACONAZOL**

Método de referencia	Metodo probado		TOTAL
	R (ATB-F)	S ( ATB-F )	
R ( CLSI )	7	4	11*
S ( CLSI )	1	38	39
TOTAL	8	42	50

\*Sensible dosis dependiente SDD; R: Resistente; S: Sensible

A partir de los datos mostrados en las Tablas 5 y 6 se calcularon la sensibilidad, especificidad y la eficacia diagnóstica para los diferentes antifúngicos evaluados; La especificidad para el FLZ fue de 100 % y la sensibilidad de 91%, con un VPP de 56%, un VPN de 100% y con una eficacia diagnóstica de 92%, calculados para un intervalo de confianza (IC) de 95%. Para el ITZ la especificidad y sensibilidad fue de 88 % y 90% respectivamente, con un VPP de 64%, un VPN de 97% y una eficacia diagnóstica de 90%, IC 95%.

Como se puede observar en los resultados, al evaluar el FLZ, este método alcanza una sensibilidad del 100%, lo que significa que tiene una alta capacidad de detectar cepas resistentes (verdaderos positivos); sin embargo, cuando se obtiene un resultado positivo por cualquiera de los dos procedimientos de sensibilidad estudiados (Técnica estandarizada o el kit comercial), este resultado no es del todo certero, existe sólo un 56 % de VPP, es decir que cuando el método comercial cataloga a las cepas como resistentes para el FLZ, se equivoca 44 veces en 100 con respecto al Gold estándar (M27-A2). Por otro lado, la especificidad fue del 91%, con un VPN de 100%, lo que indica lo buena que es la prueba para detectar cepas sensibles, equivocándose sólo en un 8% de las cepas evaluadas. Para el ITZ, el método comercial mos-



tró un desempeño diagnóstico relativamente bueno, con una sensibilidad del 88%, una especificidad del 90%, VPP y VPN 64% y 97% respectivamente, en la interpretación de estos resultados debemos destacar el bajo valor de VPP, lo que implica que cuando el método cataloga a las cepas como resistentes se equivoca 34 veces en 100.

La discordancia en los resultados positivos tanto para el FLZ como para el ITZ, posiblemente se deban a la dificultad que se tuvo en la lectura e interpretación de resultados, esto por el fenómeno de “trailing” o arrastre que *C. albicans* expresa frente a un gran número de los azoles, que hoy por hoy es una de las grandes desventajas al momento de utilizar pruebas de susceptibilidad basados en microdilución (Arikan, S., Paetznick, V., & Rex, J. H. 2012). Es precisamente por esta razón que en los últimos años se han estado introduciendo en el mercado métodos colorimétricos que faciliten la determinación de la CIM, mismos que incorporan varios indicadores colorimétricos de óxido reducción, de los que el Alamar Bleu es el más utilizado, ya que posee una buena reproducibilidad y concordancia con el estándar de la CLSI, también permite dar resultados más rápidos para los azoles y la determinación visual del punto de corte está facilitada por la presencia del indicador (Pujol, I., Javier Pastor, F., Santos Lazéra, M. D., & Guarro, J. 2008). Así mismo el documento CLSI M44-P (2004), define puntos de corte para el FLZ basados en un método de difusión de discos, En donde se considera como sensible aquellas cepas con un diámetro de halo de inhibición  $\geq 19$  mm y resistentes con un halo de inhibición  $\leq 14$  mm, con lo que la CLSI pretende subsanar la interpretación de resultados para los azoles debida al efecto de arrastre (Arikan, S., Paetznick, V., & Rex, J. H. 2012).

2. Pruebas de concordancia empleados para comparar el Gold estándar con el método comercial.

Cuando se aplica un test diagnóstico para evaluar métodos diferentes frente a un mismo grupo de muestras, se usan indicadores estadísticos de concordancia como ser el índice de Kappa. Este análisis de concordancia, determinó que existía un índice Kappa de 0,67 y 0,68 ( $p > 0,005$ ) para el FLZ e ITZ respectivamente, que corresponde a una concordancia “buena”. También se determinó el likelihood ratio, para medir la utilidad diagnóstica del método comercial, los valores obtenidos de LR+ fueron de = 11,25 y 9,19 y el LR - 0,00 y 0,140 para el FLZ e ITZ respectivamente, datos que nos indican, que un método diagnóstico es útil cuando su LR+ es alto (idealmente  $> 5-10$ ) y su LR- es bajo ( $< 0,1- 0,2$ ) (tabla7).

**TABLA 7. Resultados de correlación de los resultados obtenidos por el método comercial ATB FUNGUS 3 en comparación a la técnica de referencia M27-A2.**

MÉTODO OPTIMIZADO	INDICE DE KAPPA	INTERPRETACIÓN "Índice kappa"	Razon de Verosimilitud	Rango para Likelihood ratio	INTERPRETACIÓN Likelihood ratio
Fluconazol	0,67	Concordancia Buena	LR + 11,25 LR - 0,00	5 - 10 0,1-0,2	Prueba de utilidad diagnóstica
Itraconazol	0,68	Concordancia Buena	LR + 9,19 LR - 0,14	5 - 10 0,1-0,2	Prueba de utilidad diagnóstica

Respecto a los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño diagnóstico del método comercial, son pocos los estudios que utilizan estos parámetros para evaluar un método comercial, la mayoría realiza sólo un estudio de comparación entre ambos métodos; tales como "El estudio de evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos", llevado a cabo por Maldonado et al. (2011)., en el cual se encontró que la concordancia general entre el método de referencia y el ATB Fungus 3 fue del 90,2 %, datos que son similares a nuestros resultados; 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; siendo el ITZ la droga con más baja concordancia 79,3%; éstos de algún modo son acordes a nuestro estudio, con la diferencia que nosotros utilizamos el índice Kappa como marcador de correlación, pero en ambos casos la correlación fue buena, con la única limitante del efecto "trailing"; que ellos subsanaron utilizando el método de difusión en disco, con los que los datos de concordancia aumentaron significativamente. Existen otros estudios que encontraron resultados similares a los nuestros, como los de Eraso Et. al. (2008) donde se comparó el ATB F2 con el Sensititre Yeast one, concluyendo 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 discrepancias amplias con algunos aislamientos. Estos resultados también concuerdan con los nuestros, ya que ellos también encontraron dificultades al determinar los puntos de corte para los azoles, por otro lado, la elección del método Sensititre Yeast one, no fue del todo acertado para realizar una comparación con el ATB FUNGUS 3, ya que, para incorporar una técnica dentro de un laboratorio, la CLSI recomienda que los estudios de correlación tienen que realizarse en base a un método de referencia (CLSI M27-A2 o EUCAST). Otro estudio importante, fue el realizado por Torres- J. M., & Alvarado E. (2007)., en el cual compararon el ATB FUNGUS 2 y Sensititre Yeast one, ellos 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 aislados de *C. albicans*; los valores obtenidos en este estudio no concuerdan del todo con los nuestros, posiblemente a que no solo estuvo ausente la aplicación del mismo tipo de estudio, sino también porque la elección del método Sensititre Yeast one no fue del todo acertado para realizar una comparación con el ATB FUNGUS 3, por razones ya explicadas anteriormente.

Por todo lo mencionado, el desempeño global del ATB FUNGUS 3 sugiere que este método resulta ser práctico, efectivo y reproducible; y que además otorga resultados razonablemente buenos, en cuanto a sensibilidad, especificidad, eficacia, índice K y LR+ y LR -.

### 3. Resultados de repetitividad del ATB FUNGUS 3

Los resultados obtenidos en la prueba de repetitividad muestran, que en los tres ensayos realizados se obtuvo un 86% de repetitividad, tanto para el FLZ como para el ITZ. en ambos casos sólo se presentaron 2 discordancias en la lectura de la CIM, mismas que se encuentran resaltadas en la Tabla 8.

**TABLA 8. Resultados de repetitividad obtenidos para la prueba de ATB-FUNGUS 3, donde se muestran los valores de CIM obtenidos en cada uno de los ensayos.**

Cod - Int de la muestras	Prueba #n 1 FLZ			Prueba #n 2 FLZ			Prueba #n 3 FLZ			Prueba #n 1 ITZ			Prueba #n 2 ITZ			Prueba #n 3 ITZ		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R									
A-1	1*			16*			4*			0,125*			0,25*			0,125*		
A-2	1*			2*			1*					2*	0,5*					1*
A-3	1*			2*			2*			0,125*			0,125*			0,125*		
A-4	1*			2*			2*			0,125*			0,125*			0,125*		
A-5	1*			1*			16*			0,125*			0,125*			0,125*		

\*La muestra presento efecto de arrastre

### 4. Resultados de reproducibilidad del ATB FUNGUS 3

Para evaluar plenamente un método se debe determinar la reproducibilidad de resultados, por consiguiente, el ATB FUNGUS 3 obtuvo un porcentaje de reproducibilidad del 90% y 85% para el FLZ e ITZ. Además, que alcanzó una eficiencia diagnóstica del 92% y 90% para el FLZ e ITZ respectivamente ( $p > 0,005$ ); datos que concuerdan con resultados, encontrados en otros estudios, mismos que ya fueron discutidos en el párrafo anterior.

## CONCLUSIONES

---

La evaluación de 4 diferentes protocolos modificados con base en el documento propuesto por la CLSI (M27-A2.2002, M44. 2004 y Davel G & Cordova S. 2007)., permitió estandarizar las condiciones óptimas del método de microdilución en caldo M27-A2, para determinar la sensibilidad de *C. albicans* frente a FLZ, ITZ y KTZ; llevando a concluir que si bien se logra una buena reproducibilidad en los resultados, este método aún presenta dificultades, principalmente en su laboriosidad, con limitaciones en la detección de la resistencia a anfotericina B, por no contar con los puntos de corte; y limitaciones el crecimiento residual para fármacos como los azoles, hecho que puede ser subsanado utilizando técnicas alternativas como la difusión en disco.

Se ha demostrado que el método comercial ATB FUNGUS 3, es una técnica reproducible, rápida y de fácil realización; pero el desempeño global de la técnica, sugiere que aún no es confiable para su uso en los laboratorios de análisis clínicos, debido principalmente, a los valores bajos obtenidos en los VPP para los antifúngicos FLZ y ITZ, lo que podría derivar en errores al momento de determinar una cepa como sensible o resistente, punto importante al momento de decidir la conducta terapéutica, siendo de gran relevancia en pacientes críticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Arikan, S., Paetznick, V., & Rex, J. H. (2012, septiembre). Comparative Evaluation of Disk Diffusion with Microdilution Assay in Susceptibility Testing of Caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3084–3087. <https://doi.org/10.1128/aac.46.9.3084-3087.2002>
- Ballesté, Raquel, Arteta, Zaida, Barloco, Ana, Mier, Cristina, Fernández, Nora, Mousqués, Nélica, Xavier, Beatriz, Cabrera, María José, Combol, Ana, & Gezuele, Elbio. (2006). Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión en agar Etest® para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Médica del Uruguay*, 22(2), 128-135. Recuperado en 11 de abril de 2021, de [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902006000200008&lng=en](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902006000200008&lng=en)
- Bertout, S., Dunyach, C., Drakulovski, P., Reynes, J., & Mallié, M. (2011, febrero). Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathologie Biologie*, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.07.020>
- Davel G, Cordova S. (2007, abril). Curso a Distancia y Taller: "Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos" Departamento Micología INEI, ANLIS "Dr. C. G. Malbrán" Buenos aires, Argentina.
- Eraso, E., Ruesga, M., Villar-Vidal, M., Javier Carrillo-Muñoz, A., Espinel-Ingroff, A., & Quindós, G. (2008, marzo). Evaluación comparativa de ATB Fungus 2 y Sensititre YeastOne en el estudio de la sensibilidad in vitro de *Candida* a los antifúngicos. *Revista Iberoamer-*



- icana de Micología, 3–6. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70002-0](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70002-0)
- Galván, B., & Mariscal, F. (2006, marzo). Epidemiología de la candidemia en UCI. *Revista Iberoamericana de Micología*, 12–15. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(06\)70005-5](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(06)70005-5)
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (2009, octubre). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 501–517. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.501>
- Henriques, M., & Williams, D. (2020, septiembre). Pathogenesis and Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Pathogens*, 752. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090752>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeast. Approved Standar. Document M27-A2.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Approved standard M44-A.
- Maldonado I, Fernández L, Vivot W, Domec P, Davel G & Córdoba S. (2011 Junio). Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos. *Rev. argent. microbiología*. <https://www.researchgate.net/publication/262613942>
- P, D. S. (2018a, septiembre). Fluconazole Susceptibility of *Candida* Species. *Journal of Medical Science And clinical Research*. <https://doi.org/10.18535/jmscr/v6i9.175>
- Pujol, I., Javier Pastor, F., Santos Lazéra, M. D., & Guarro, J. (2008, diciembre). Evaluación del método de difusión en agar Neo-Sensitabs® para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos de *Cryptococcus gattii*, utilizando tres medios de cultivo diferentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 215–220. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70052-4](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70052-4)
- Rodríguez Tudela, L., & Cuenca Estrella, M. (2012, enero). ¿Ha servido para algo una década estandarizando las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 191–193. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72787-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72787-0)
- Torres-Rodríguez, J. M., & Alvarado-Ramírez, E. (2007, julio). In vitro susceptibilities to yeasts using the ATB® FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One® and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 658–661. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm247>