

Artículo original

Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género *Fusarium*

Liset Lage, María Mercedes Panizo*, Giuseppe Ferrara, Vera Reviakina

Departamento de Micología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Recibido 28 de mayo de 2012; aceptado 12 de diciembre de 2012

Resumen: El objetivo de este trabajo fue validar la preparación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género *Fusarium*. Se emplearon 15 aislamientos clínicos de *Fusarium* spp. para preparar los inóculos por espectrofotometría y conteo de unidades formadoras de colonias en cámara de Neubauer, siguiendo los protocolos establecidos por los documentos de referencia M38-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y E.DEF 9.1 del Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), respectivamente. En paralelo se determinaron las lecturas por densitometría para ambos procedimientos. Se estableció un rango de 0,5-0,7 unidades McFarland para la preparación del inóculo por densitometría según el CLSI, y un rango de 0,2-0,8 unidades McFarland para la metodología descrita por el EUCAST. Con este estudio, se logró validar la preparación del inóculo para las pruebas de susceptibilidad en *Fusarium* spp., utilizando la densitometría como método alternativo de los procedimientos descritos internacionalmente, con considerables ventajas para ser implementado en los laboratorios de microbiología clínica. La variabilidad en cuanto a la capacidad de esporulación y tamaño de las conidias, sobre todo en especies poco frecuentes de *Fusarium*, sugiere la necesidad de validar el inóculo por especie.

Palabras clave: *Fusarium* spp., inóculo, pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos, CLSI, EUCAST, densitometría.

Validation of the inoculum by densitometry for antifungal susceptibility testing in *Fusarium* species

Abstract: The purpose of this work was to validate the preparation of the inoculum by densitometry for antifungal susceptibility testing in *Fusarium* species. Fifteen clinical isolates of *Fusarium* spp. were used to prepare the inocula by spectrophotometry and counting of colony forming units in a Neubauer chamber, according to the protocols established by the reference documents M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and E.DEF 9.1 of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), respectively. Densitometry readings were determined in parallel for both procedures. A range of 0.5-0.7 McFarland units was established for inocula preparation by densitometry according to the CLSI, and a range of 0.2-0.8 McFarland units was established for the methodology described by EUCAST. This study allowed validating the preparation of the inocula for antifungal susceptibility testing in *Fusarium* spp., using densitometry as an alternative method for other procedures described internationally, with considerable advantages that can be implemented at clinical microbiology laboratories. The variability regarding sporulation capacity and conidia size, especially in less frequent *Fusarium* species, suggests the need of validating inocula per species.

Keywords: *Fusarium* spp., inoculum, antifungal susceptibility tests, CLSI, EUCAST, densitometry.

* Correspondencia:
E-mail: mmpanizo@gmail.com

Introducción

El género *Fusarium* está representado por hongos filamentosos hialinos, de distribución universal, ubicuos y habitualmente fitopatógenos. En los últimos años, se han convertido en la segunda causa más frecuente de infecciones invasoras por hongos filamentosos en

humanos, después del género *Aspergillus*, registrándose altas tasas de incidencia y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, principalmente por las especies de los complejos *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* [1-3]. El diagnóstico definitivo de estas infecciones no es sencillo y suele ser tardío, por lo que se ha planteado la necesidad de desarrollar procedimientos más eficaces para lograr una

mejor identificación de estos hongos en los laboratorios de microbiología. Por otra parte, el tratamiento es complicado y se ha convertido en un verdadero reto para los médicos [2,4]. La creciente aparición de infecciones invasoras por hongos filamentosos patógenos y oportunistas, a raíz de la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la aparición y desarrollo de nuevos antifúngicos, el uso indiscriminado de estas drogas y las diferentes respuestas terapéuticas a los tratamientos, han generado interés en la realización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para los hongos filamentosos [2,4-6].

Actualmente, se dispone de dos procedimientos estandarizados para la realización de estas pruebas: 1) el documento M38-A2 [7], elaborado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI), que especifica la realización de las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*), *Scedosporium prolificans*, Zygomycetes y dermatofitos, entre otros; y 2) el documento E.DEF 9.1, elaborado por el Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), en el cual se estandarizó una metodología común para evaluar la susceptibilidad en hongos filamentosos productores de conidias [8].

En ambos documentos se determinan Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) por la técnica de microdilución en caldo, pero son procedimientos complicados debido a la influencia de factores como temperatura de crecimiento del hongo, composición y pH del medio de cultivo, tiempo de incubación de la prueba y el tamaño del inóculo. Para este último, ambos documentos presentan diferencias metodológicas en cuanto a su preparación, un aspecto importante y crítico que influye significativamente en los valores de susceptibilidad antifúngica, especialmente debido al manejo, recuento, dilución y transferencia de conidias [7-13].

En el documento elaborado por el CLSI se prepara el inóculo utilizando la espectrofotometría, metodología muy reproducible pero condicionada a características morfológicas propias del hongo [7,14,15]. En el documento del EUCAST se utiliza el conteo de conidias en cámara de Neubauer, metodología que sugiere cierta subjetividad dependiente de la observación del operador, pero independiente del color y del tamaño de las conidias [8,13]. Si bien ambos documentos proporcionan metodologías válidas para la preparación del inóculo en una gran variedad de hongos filamentosos, las notables diferencias existentes entre ellos han sido objeto de múltiples estudios comparativos al tratar de relacionarlos, con resultados variables [5,9,10,14,16-19]. Algunos de estos estudios, además de correlacionar las metodologías anteriormente descritas, plantean alternativas más sencillas como el uso de la densitometría, la cual determina la relación entre la masa de células (conidias) y el volumen de solución en la que se encuentran suspendidas mediante el densitómetro; este designa las lecturas de las suspensiones

de conidias en la escala de unidades McFarland [14,15,20].

Araujo *et al.* [14], encontraron una buena correlación entre las metodologías descritas en los documentos del CLSI y EUCAST con la densitometría en la preparación del inóculo de *Aspergillus* spp., concluyendo que este último método era una herramienta muy valiosa, más rápida, confiable y de fácil acceso para los laboratorios de microbiología clínica, ya que reduce la variabilidad durante la preparación del inóculo para las pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos. La utilización de la densitometría, como método para la preparación del inóculo, no ha sido evaluada en hongos del género *Fusarium*.

Considerando la normalización del inóculo como un problema para la realización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* [4,9-11,13-18,20], esta investigación plantea, mediante un estudio experimental y comparativo, validar la preparación del inóculo en hongos del género *Fusarium* mediante el uso de la densitometría, utilizando las bases de preparación del mismo propuestas por los documentos del CLSI y EUCAST. El propósito fundamental es disponer de un método fácil de adaptar e implementar en un laboratorio de microbiología clínica de rutina, lo que ayudará posteriormente al conocimiento de los perfiles de susceptibilidad y/o resistencia a los antifúngicos en hongos del género *Fusarium*.

Materiales y métodos

Microorganismos: Se utilizaron 15 aislamientos clínicos de 6 especies del género *Fusarium*, pertenecientes a la Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), los cuales estaban conservados por los métodos de preservación en agua y bajo capa de aceite mineral [21,22] (Tabla 1). La recuperación de los aislamientos se realizó cultivándolos por 7 días a 28 °C en agar papa dextrosa (PDA), verificándose viabilidad y pureza.

Preparación del inóculo: Se procedió a la preparación del inóculo siguiendo las metodologías descritas por los documentos M38-A2 del CLSI y E.DEF. 9.1 del EUCAST [7,8]. Se realizó el cultivo por triplicado de los 15 aislamientos de *Fusarium* spp. en PDA, incubándolos 48 h a 35 °C y luego a 28 °C hasta completar 7 días. En el caso de no observar una adecuada esporulación en el tiempo estipulado, se aumentó el tiempo de incubación hasta 14 días.

Determinación del inóculo por espectrofotometría. Documento M38-A2 del CLSI [7]: Con un asa impregnada en solución Tween 20 se rasparon las porciones superficiales de las colonias, las cuales fueron resuspendidas en 3 mL de solución salina estéril al 0,85% y se dejaron sedimentar de 5 a 7 min. Luego se tomaron los sobrenadantes y se colocaron en tubos estériles, para ser transferidos posteriormente a las cubetas de lectura de un espectrofotómetro semi-automatizado (Spectronic® 20 Genesys™; Spectronic

Tabla 1. Especies de *Fusarium* usadas en el estudio.

Especies	Código Micoteca INHRR
	30310515
	20249
Complejo <i>Fusarium solani</i> (n=6)	31009
	F-412000-3
	F-412000-90
	F-412000-91
	1156
Complejo <i>Fusarium oxysporum</i> (n=3)	202
	31703
	31809
Complejo <i>Fusarium verticillioides</i> (n=3)	12450
	31839
<i>Fusarium subglutinans</i> (n=1)	F-412000-95
<i>Fusarium proliferatum</i> (n=1)	113
<i>Fusarium falciforme</i> (n=1)	32100

INHRR: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Instruments). Se ajustó el inóculo a lecturas entre 0,15-0,17 densidades ópticas (DO) a una longitud de onda de 530 nm. Según el documento, la suspensión del inóculo obtenida debe diluirse 1:50 para obtener la dilución de trabajo correspondiente a $0,4-5 \times 10^4$ conidias/mL; este procedimiento no se realizó debido a que el inóculo no sería utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad.

Determinación del inóculo por conteo de conidias en cámara de Neubauer. Documento E.DEF. 9.1 del EUCAST [8]: En cada tubo con crecimiento del hongo, se colocaron 5 ml de agua destilada estéril. Se agitaron vigorosamente durante 15 seg en un vórtex a 2.000 rpm y se dejaron sedimentar 10 min. Luego se tomó una alícuota del sobrenadante para realizar el conteo en cámara de Neubauer, ajustando entre $2-5 \times 10^6$ conidias/mL, calculando el número de conidias mediante la siguiente fórmula: $N^\circ \text{ de conidias/mL} = N^\circ \text{ de conidias contadas} \times 1000 \times 20 / 0,4$. La presencia de hifas fue verificada durante el conteo de las conidias. No se procedió al filtrado de la suspensión ya que estos elementos no superaron el 5%. Según el documento, la suspensión de inóculo obtenida debe diluirse 1:10 para obtener la dilución de trabajo correspondiente a $2-5 \times 10^5$ conidias/mL; este procedimiento no se realizó, debido a que el inóculo no sería utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad.

Determinación del inóculo por densitometría: Una vez

ajustados los inóculos según los estándares internacionales, se procedió a determinar en paralelo para cada procedimiento las unidades McFarland en el densitómetro (Densimat™ ViteK; bioMérieux) a 550 nm.

Contaje de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL): Para verificar las conidias viables, de todas las suspensiones ajustadas y leídas por densitometría, se realizaron diluciones 1:100 de los inóculos, se sembraron 0,01 mL por agotamiento en placas de agar Sabouraud y se incubaron a 35 °C por 72 horas. Luego se realizaron los contajes de las UFC/mL, los cuales debían oscilar entre $1-5 \times 10^6$ UFC/mL y $2-5 \times 10^6$ UFC/mL según las metodologías del CLSI y EUCAST, respectivamente [7,8,13,19].

Control de calidad: Se utilizaron como cepas de referencia *Aspergillus fumigatus* ATCC® MYA 3627 y *Aspergillus flavus* ATCC® 204304, recomendadas en el documento M38-A2 del CLSI [7], las cuales fueron tratadas de igual forma que los aislamientos empleados en el estudio.

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y en días diferentes para cada una de las especies del género *Fusarium* incluidas en el estudio.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron descritos utilizando medidas de tendencia central. Se calcularon los coeficientes de variación (CV) obtenidos por cada metodología. Para comparar los resultados obtenidos de la preparación del inóculo por densitometría con los obtenidos por las metodologías estandarizadas y medir el grado de asociación entre ambas variables, se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson (R), interpretando los resultados según la escala numérica: 0,0 a 0,2: correlación mínima; 0,21 a 0,40: correlación baja; 0,41 a 0,60: correlación moderada; 0,61 a 0,8: correlación buena; 0,81 a 1,0: correlación muy buena. También se calcularon los porcentajes de concordancia (%C) entre las variables, a través de tablas de contingencia 2 x 2 y los intervalos de confianza a 95% (IC 95%), para niveles de significancia menores o iguales a 0,05 [23]. Todos los datos fueron procesados mediante los programas estadísticos Excel y SPSS versión-17 para Windows. Cada valor se introdujo de forma individual para el análisis de datos.

Resultados y discusión

Se realizaron 72 determinaciones, de las cuales 43 correspondieron al complejo *F. solani*, 12 al complejo *F. oxysporum*, 7 al complejo *F. verticillioides*, 5 a *F. proliferatum*, 3 a *F. subglutinans* y 2 a *F. falciforme*. Para los análisis estadísticos, los datos obtenidos para las especies de los complejos *F. solani* y *F. oxysporum* fueron estudiados independientemente; por el contrario, los datos del complejo *F. verticillioides*, así como de *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. falciforme* fueron agrupados y estudiados en conjunto, debido a que estos últimos no esporularon eficientemente y el número de determinaciones realizadas

se redujo notablemente.

La disminución de la capacidad de esporulación puede deberse a que estos hongos, habitualmente fitopatógenos, no encuentran en los medios de cultivo las condiciones proporcionadas por su medio ambiente natural, sobre todo en lo que respecta a la disponibilidad de carbohidratos, la cual debe ser baja. Los métodos de agua por Castellani y bajo capa de aceite mineral, utilizados para la preservación y mantenimiento de hongos en colecciones de cultivo, han demostrado que son capaces de preservar aislamientos fúngicos de forma estable por largos períodos de tiempo, asegurando sus características macro y microscópicas, así como su viabilidad y pureza; la concentración de carbohidratos provista en el medio de cultivo del método de capa de aceite mineral es muy baja, con la finalidad de disminuir su metabolismo [21,22]. Por otra parte, el PDA es un medio de cultivo útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia, sin embargo, su alto contenido en carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, en detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes en algunas especies [24].

Resultados obtenidos siguiendo la metodología del CLSI:

Al analizar la correlación para las especies de *Fusarium* incluidas en este estudio, entre las lecturas obtenidas por espectrofotometría y densitometría, se obtuvo un grado de asociación catalogado como bueno ($R=0,62$), mientras que la correlación entre las lecturas densitométricas y espectrofotométricas con el conteo de UFC en cultivo, mostraron asociaciones bajas y mínimas, respectivamente (Tabla 2).

Estos resultados fueron corroborados al analizar los coeficientes de variación (CV) de las lecturas obtenidas para cada variable. La variabilidad entre las lecturas obtenidas por espectrofotometría fue baja, no superando el 6%, ya que las lecturas debían mantenerse ajustadas al rango establecido por el protocolo del CLSI (entre 0,15-0,17 DO); la variabilidad de las lecturas obtenidas por densitometría fue inferior al 20% y el conteo de UFC mostró la mayor variabilidad entre los resultados obtenidos para las especies de *Fusarium* estudiadas. Es importante destacar que las lecturas obtenidas por densitometría fueron muy reproducibles, manteniéndose en un rango entre 0,5-0,7 unidades McFarland. Por el contrario, la reproducibilidad de los conteos de UFC en cultivo fueron muy variables, con un rango entre 0,3-3,9 $\times 10^6$ UFC/mL. Los resultados obtenidos para los complejos *F. solani*, *F. oxysporum* y las otras especies de *Fusarium* mantuvieron la misma tendencia observada anteriormente, tanto para los análisis de correlación como para los CV (Tabla 2).

Los porcentajes de concordancia obtenidos al realizar las comparaciones entre los resultados de las lecturas por espectrofotometría, densitometría y el conteo de UFC fueron variables. Los coeficientes de correlación mostraron asociaciones bajas o mínimas al realizar las comparaciones entre las variables. Esto se debió a la elevada variabilidad de los resultados obtenidos en el conteo de UFC, aún

manteniéndose dentro del rango propuesto por el protocolo del CLSI y por otros autores ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) [7,13,19] (Tabla 2). El conteo de UFC en cultivo es un procedimiento sujeto a muchas variables en su ejecución, entre ellas la realización de la suspensión del inóculo y el volumen a colocar en las placas para proceder posteriormente a la siembra por agotamiento del inóculo diluido.

Los resultados de esta investigación son difíciles de comparar con los de otros investigadores, ya que la mayoría de los trabajos revisados fueron realizados con hongos filamentosos del género *Aspergillus*, los cuales son muy diferentes al género *Fusarium*, tanto en aspecto morfológico como en características fisiológicas y requerimientos de cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos por Araujo *et al.* [14], son comparables a los obtenidos en este estudio; aunque no llegaron a establecer valores de concordancia entre los métodos, obtuvieron una asociación muy buena entre ambas variables al correlacionar las lecturas espectrofotométricas con las densitométricas obtenidas en la preparación del inóculo.

Analizando los rangos de las lecturas densitométricas obtenidas, es posible que el tamaño de las conidias fuese una variable interviniente en esta metodología, lo que implica que es necesario preparar un inóculo por especie siguiendo esta propuesta. Lo importante es tomar en cuenta la fisiología y las características de crecimiento de cada especie de *Fusarium* al momento de realizar el conteo de UFC/mL, ya que fue durante estos conteos donde se obtuvo la mayor variabilidad. Esto se observó particularmente en las especies poco comunes de *Fusarium* utilizadas en el estudio, como complejo *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. falciforme*, las cuales no esporularon de forma adecuada y además requirieron en algunos casos más de 72 horas para poder realizar el conteo de UFC en cultivo.

Los resultados no fueron influenciados por el color de las conidias; aun cuando algunas especies del género producen pigmento, el cual en la mayoría de los casos se transfirió a la solución del inóculo preparado, éste no afectó de forma alguna los resultados obtenidos.

Es posible que uno de los factores que más afecte este tipo de lecturas sea la presencia de hifas, sobre todo en especies que no esporulan eficientemente, obteniéndose lecturas erradas de turbidez heterogénea en vez de homogénea, como la que se observa en un inóculo a base de conidias. Esto se evidenció en las bajas correlaciones obtenidas al comparar las lecturas densitométricas y espectrofotométricas con el conteo de UFC/mL, a pesar que en este estudio el porcentaje de hifas presentes se mantuvo por debajo del 5%, tal y como lo requiere la metodología del CLSI.

En líneas generales, los rangos estrechos de lectura obtenidos por densitometría para las especies del género *Fusarium* indicaron la posibilidad de que el inóculo puede ser preparado utilizando este procedimiento, ya que hay una elevada reproducibilidad. Sin embargo, los elevados CV obtenidos y la moderada o baja correlación hallada al comparar las lecturas densitométricas con las UFC/mL obtenidas en cultivo, indicaron que la preparación del

Tabla 2. Coeficiente de variación, grado de asociación y concordancia entre las variables estudiadas para la determinación del inóculo según los métodos M38-A2 del CLSI y E.DEF 9.1 del EUCAST.

Métodos de preparación del inóculo y variables	Especies de <i>Fusarium</i>				
		Todas las especies	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Otros <i>Fusarium</i> *
CLSI	N°	72	43	12	17
	CV (%)	4,97	4,97	5,66	4,27
DO (530nm)	IC 95%	0,15-0,17	0,15-0,17	0,15-0,17	0,15-0,17
	X	0,16	0,16	0,16	0,16
	CV (%)	17,47	18,27	16,13	15,74
UMcF	IC 95%	0,50-0,71	0,50-0,71	0,47-0,65	0,53-0,73
	X	0,60	0,60	0,56	0,63
	CV (%)	74,64	65,89	69,78	81,68
UFC/mL (x10 ⁶)	IC 95%	0,50-3,4	0,81-3,91	0,36-2,02	0,27-2,61
	X	1,90	2,36	1,19	1,44
	R	0,62	0,66	0,63	0,47
DO vs. UMcF	%C	82,00	81,40	83,30	82,40
	R	0,34	0,31	0,60	0,42
UMcF vs. UFC/mL	%C	65,30	72,10	83,30	58,80
	R	0,11	0,14	0,10	0,11
DO vs. UFC/mL	%C	79,20	88,40	91,70	70,60
EUCAST	N°	70	43	10	13
	CV (%)	57,76	57,02	64,76	86,91
Contaje CN	IC 95%	0,97-3,63	1,89-4,03	0,55-2,53	0,12-2,02
	X	2,3	1,07	1,54	1,07
	CV (%)	54,63	54,30	18,11	38,30
UMcF	IC 95%	0,20-0,70	0,24-0,80	0,30-0,44	0,20-0,46
	X	0,45	0,28	0,37	0,33
	CV (%)	71,60	57,09	55,86	142,24
UFC/mL (x10 ⁶)	IC 95%	0,67-4,07	1,24-4,52	0,83-2,91	0,00-2,98
	X	2,37	2,88	1,87	1,23
	R	0,65	0,57	0,57	0,91
CN vs. UMcF	%C	68,60	79,10	80,00	88,20
	R	0,38	0,24	0,36	0,80
UMcF vs. UFC/mL	%C	51,40	62,80	80,00	61,50
	R	0,72	0,63	0,77	0,96
CN vs. UFC/mL	%C	86,70	74,40	83,30	84,60

*Incluye: *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. falciforme*. DO: densidades ópticas; UMcF: unidades McFarland; UFC: unidades formadoras de colonias; CN: cámara de Neubauer; CV: coeficiente de variación; IC 95%: intervalo de confianza; X: media aritmética; R: coeficiente de correlación; %C: porcentaje de concordancia.

inóculo de cada especie de *Fusarium* debe ser validada por separado.

Resultados obtenidos siguiendo la metodología del EUCAST: En el análisis de correlación para las especies de *Fusarium*, se obtuvo un grado de asociación bueno ($R=0,65$) entre los resultados obtenidos del conteo de UFC por cámara de Neubauer y las lecturas por densitometría: la concordancia entre ambas metodologías fue 68,6%. Resultados similares se obtuvieron al correlacionar el conteo de conidias por microscopía y UFC en cultivo. Se partió del hecho de que cada conidia contada debería dar origen a una colonia en cultivo, pero la variabilidad de los conteos de UFC fue elevada, ya que el rango establecido para esta variable propuesto por el EUCAST es muy amplio, y debía mantenerse entre $2-5 \times 10^6$ UFC/mL. Sin embargo, el grado de asociación fue bajo al correlacionar las lecturas por densitometría con el conteo de UFC en cultivo (Tabla 2).

Estos resultados fueron corroborados al analizar los CV de las lecturas obtenidas para cada variable. La variabilidad de los resultados obtenidos por el conteo de conidias por cámara de Neubauer y por densitometría fue de 57,76 y 54,63%, mientras que la variabilidad del conteo de UFC en cultivo fue de 71,6%.

Los resultados obtenidos para los complejos *F. solani* y *F. oxysporum* mantuvieron la misma tendencia observada anteriormente, tanto para los análisis de correlación como para los CV (Tabla 2).

Las especies de *Fusarium* agrupadas mostraron un grado de asociación muy bueno al correlacionar entre sí las distintas variables del estudio. Por otra parte, los resultados de los CV mostraron variabilidad entre las lecturas obtenidas por densitometría y los conteos de UFC por microscopía y en cultivo. Adicionalmente, mostraron en general escaso crecimiento en los cultivos y una baja capacidad de esporulación, con la excepción de *F. subglutinans*. Los resultados obtenidos en estos análisis estadísticos son a expensas de esta especie (Tabla 2). Los porcentajes de concordancia obtenidos al realizar las comparaciones entre los resultados obtenidos por densitometría y conteos de UFC por microscopía y cultivo fueron variables. Los coeficientes de correlación, mostraron asociaciones entre moderadas a muy buenas. Esto se debió a la elevada variabilidad de los resultados obtenidos en el conteo de UFC, tanto por cámara de Neubauer como por cultivo, aún manteniéndose dentro del rango propuesto por el protocolo del EUCAST ($2-5 \times 10^6$ UFC/mL) (Tabla 2).

A pesar de estos resultados, las lecturas obtenidas por densitometría fueron reproducibles, manteniéndose en un rango entre 0,2-0,8 unidades McFarland, estableciendo un margen más estrecho para la lectura, a diferencia de lo establecido por la metodología del EUCAST para el conteo de UFC, tanto por microscopía como por cultivo.

Los resultados de esta investigación no son comparables con los de otras investigaciones, debido a que sólo se han confrontado los conteos de UFC en cámara de Neubauer

con los obtenidos por cultivo [13,19] y de estos con lecturas espectrofotométricas [9]. No se han realizado estudios para comparar estas metodologías con las lecturas densitométricas, razones por las cuales este es un trabajo pionero en su estilo.

Sin embargo, en relación a lo expresado anteriormente, Petrikkou *et al.* [19], obtuvieron un grado de asociación moderado ($R=0,57$) al correlacionar el conteo de UFC en cámara de Neubauer versus las UFC obtenidas en cultivo para el complejo *F. solani*, con rangos para conteo de UFC por microscopía entre $2,5-3,3 \times 10^6$ UFC/mL y de $1,6-2,4 \times 10^6$ UFC/mL para conteo de colonias en cultivo. Al correlacionar el conteo de conidias por cámara de Neubauer con las lecturas espectrofotométricas, el grado de asociación de las variables fue mínimo ($R=0,01$), aunque el rango de lectura obtenido no presentó una gran variabilidad, sugiriendo que las lecturas fueron reproducibles. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para el complejo *F. solani* en este estudio con ligeras variaciones en el rango obtenido para conteo de UFC en cultivo. Los resultados obtenidos por Aberkane *et al.* [9] fueron diferentes, encontrando un grado de correlación moderado ($R=0,58$) al relacionar el conteo de UFC por cámara de Neubauer con las lecturas espectrofotométricas para el complejo *F. solani*.

Estos resultados contradictorios posiblemente se deben al tamaño de las conidias, variable interviniente durante el ajuste de las lecturas usando el procedimiento espectrofotométrico, lo que sugiere la necesidad de preparar el inóculo por separado para cada especie de *Fusarium*, hipótesis que ha sido sugerida en algunas investigaciones [9,13,19]. El conteo de conidias en cámara de Neubauer no es afectado por el tamaño de las conidias, ya que es independiente de la turbidez del inóculo preparado [9,13,14,17-19].

Al igual que en la metodología propuesta por el CLSI, los rangos de lectura obtenidos por densitometría para las especies del género *Fusarium* indicaron la posibilidad de que el inóculo puede prepararse utilizando este procedimiento, debido a su reproducibilidad. A pesar de los elevados CV obtenidos, y aún cuando los coeficientes de correlación hallados al comparar las lecturas espectrofotométricas con las densitométricas muestran una buena asociación, estos indicaron que el inóculo de cada especie de *Fusarium* debe ser validado por separado, evidenciándose particularmente con las especies poco comunes del género.

Finalmente, con este estudio, se logró validar la preparación del inóculo para las pruebas de susceptibilidad en especies del género *Fusarium*, utilizando la densitometría como método alternativo, comparable y sustitutivo de los procedimientos estándares descritos internacionalmente, con considerables ventajas (útil, disponible y reproducible) para ser implementados en los laboratorios de microbiología clínica. Las lecturas densitométricas con el uso del Densimat®, permitieron establecer intervalos de 0,5-0,7 y de 0,2-0,8 unidades McFarland para la preparación del inóculo, siguiendo los lineamientos descritos por el CLSI y EUCAST respectivamente.

La variabilidad en cuanto a la capacidad de esporulación

y tamaño de las conidias, sobre todo en las especies poco frecuentes del género *Fusarium*, sugiere la necesidad de validar el inóculo por especie. El conteo de UFC/mL en cultivo, como procedimiento de verificación de una preparación adecuada del inóculo, es uno de los principales inconvenientes para la normalización de estas técnicas.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Rafael Borges, por su asesoría en el análisis de los datos estadísticos, a los señores Williams Montes y Johan Istúriz, personal técnico y auxiliar del Dpto. de Micología del INHRR y al Dr. Vidal Rodríguez-Lemoine y Lic. Juana Vitelli por facilitar el espectrofotómetro utilizado en este estudio.

Trabajo parcialmente financiado por el proyecto Fonacit Lab N° 2000001518.

Declaración de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Godoy P, Colombo A. Biología e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. *Prática Hospitalar*. 2004; 34:136-40.
- Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20:695-704.
- Olivares R, Alfaro J, Diaz MC, Thompson L. Disseminated fusariosis by *Fusarium oxysporum* in an adult patient with acute myeloid leukemia and severe febrile neutropenia. *Rev Chil Infect*. 2005; 22:356-60.
- Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect*. 2009; 26:144-50.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *J Clin Microbiol*. 2001; 14:643-58.
- Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 56:2683-5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard - Second edition. CLSI document M38-A2 Wayne, PA; 2008.
- Antifungal MIC method for conidia forming moulds. EUCAST Definitive document E.DEF 9.1: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); 2008.
- Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Petrikkou E, Mellado E, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, and the Eurofung Network. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50:719-22.
- Gehrt A, Peter J, Pizzo P, Walsh T. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1302-7.
- Gomez-Lopez A, Aberkane A, Petrikkou E, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol*. 2005:1251-5.
- Johnson E. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 13-8.
- Rodríguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:5236-7.
- Araujo R, Rodrigues A, Pina-Vaz C. A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J Med Microbiol*. 2004; 53:783-6.
- Rojas García OC, Vivas Alcalá J, Guerrero Onofretti AJ. Estandarización del inóculo de *Cladophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2004; 24:89-94.
- Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the EUCAST-AFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against *Aspergillus* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:901-4.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr C, Fothergill A, et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 1997; 35:139-43.
- Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:2760-2.
- Petrikkou E, Rodríguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol*. 2001:1345-7.
- Cermeño J, Torres J. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15:155-7.
- Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg*. 1967; 70:181-4.
- Panizo M, Reviakina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2005; 25: 35-40.
- Riegelman RK, Hirsch RP. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. Publicación Científica 531. 2da Edición. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, 1992.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*. 1994; 7:479-504.