

Estandarización de un método de evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos según la norma M38-A2 en *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Standardization of a method for evaluating susceptibility to antifungals according to standard M38-A2 in *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

MC. Arredondo-Vélez^{1*}, JJ. Tamayo-Velásquez², K. Valencia-Aristizábal³, JC. Zuluaga-Jiménez⁴

Pregrado en Química Farmacéutica, Universidad CES, Medellín, Colombia
Arredondov.maria@uces.edu.co^{1*}, tamayov.juan@uces.edu.co²,
valencia.katerin@uces.edu.co³, Zuluaga.julieth@uces.edu.co⁴

Resumen: Los cultivos de banano se ven afectados por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* que cuando se encuentra en el suelo, ingresa a la planta por sus raíces, invade los tejidos internos y ocasiona su muerte. Este hongo es altamente resistente, lo que representa un problema para los cultivos alimentarios. Para abordar esta problemática existen técnicas que permiten evaluar la susceptibilidad a diferentes fungicidas, tales como, difusión, dilución, microdilución e inhibición de la germinación de conidias o esporas, y estas permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima efectiva (MEC). Estas metodologías requieren de un trabajo intensivo de preparación de inóculos, medios de cultivo, entre otros y la interpretación puede, en ocasiones, ser subjetiva. El método de microdilución estándar, norma M38-A2 de la CLSI, es una técnica sensible, estandarizable, y que puede ser implementada en platos de 96 pozos, por lo cual sirve como metodología de screening o monitoreo. Mediante esta investigación se pretendió estandarizar este método para la evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, teniendo como base el método sugerido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); M38-A2, que permitiría evaluar sustancias promisorias de forma rápida y a bajo costo.

Palabras clave: Estandarización, Fungicida, *Fusarium*, Inhibición, Microdilución, Resistencia.

Abstract: Banana crops are affected by the fungus *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* that when it is in the soil, it enters the plant through its roots, invades the internal tissues and causes its death. This fungus is highly resistant, posing a problem for food crops. To address this problem, there are techniques that allow evaluating the susceptibility to different fungicides, such as diffusion, dilution, microdilution and inhibition of conidia or spore germination, and these allow determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum effective concentration (MEC).

These methodologies require intensive work to prepare inocula, culture media, among others, and the interpretation can, at times, be subjective. The standard microdilution method, CLSI standard M38-A2, is a sensitive, standardizable technique that can be implemented in 96-well plates, for which it serves as a screening or monitoring methodology. Through this research, it was intended to standardize this method for the evaluation of the susceptibility to antifungals of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, based on the method suggested by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); M38-A2, which would allow promising substances to be evaluated quickly and at low cost.

Keywords: Standardization, Fungicide, *Fusarium*, Inhibition, Microdilution, Resistance.

INTRODUCCIÓN

Agronómica y económicamente, *Fusarium* es uno de los géneros de hongos más importantes. Ocupó el quinto lugar en un listado de los principales patógenos de plantas en función de su importancia científica/económica. En este taxón, *Fusarium oxysporum* es un complejo de especies, que incluye tanto especies no patógenas como patógenos de plantas que causan marchitez vascular, y pudriciones de raíces en cientos de plantas hospedantes. Hasta ahora, se han descrito más de 150 formas específicas a huésped de *F. oxysporum* conocidas como formae speciales, y cada forma specialis (f. sp.) tiene la capacidad de infectar una especie de planta huésped única.

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc) es el causante de una de las principales enfermedades fúngicas del banano; marchitamiento por *Fusarium*, coloquialmente conocido como Enfermedad de Panamá o Mal de Panamá, que amenaza la producción global de este cultivo, fuente importante de ingresos en alrededor de 135 países productores, entre ellos, Colombia.

Al no existir opciones de control, la Enfermedad de Panamá se considera la más importante en el sistema productivo del banano, con especial atención en regiones de Latinoamérica y

el Caribe. Es extremadamente destructiva y, en el siglo pasado, causó una epidemia que devastó la industria bananera basada en “Gros Michel-AAA”. El mencionado brote de la enfermedad de Panamá en Gros Michel se asocia a la raza 1 del patógeno, que está distribuido a nivel mundial y por lo tanto obligó a la industria bananera a desplegar cultivares resistentes, ahora del subgrupo Cavendish, lo que permitió continuar plantando en suelos infestados con raza 1. Sin embargo, surgió en el sudeste asiático la destructiva raza 4 tropical (*Fusarium oxysporum f.sp. cubense RAT*), que es actualmente la principal amenaza para la producción global de banano (1). Las plantas infectadas a menudo mueren antes de producir racimos, por lo tanto, la enfermedad reduce significativamente los rendimientos en los campos afectados.

El enfoque de este proyecto fue establecer un método estandarizado que permita analizar de forma confiable la susceptibilidad de Foc a antifúngicos in vitro, y pueda predecir una correlación entre la actividad obtenida y los resultados in vivo y en campo, obtener datos acerca del desarrollo de resistencia, y permita estudiar los compuestos que potencialmente serían nuevas formulaciones antifúngicas. Contar con este método estandarizado según la norma M38-A2 agiliza los procedimientos y permite el procesamiento de mayor cantidad de muestras en menor tiempo, aumenta la capacidad de evaluar la actividad antifúngica de diferentes sustancias, y facilita la interpretación de resultados (2).

La investigación pretende contribuir a un estudio de mayor alcance: la búsqueda de un tratamiento efectivo contra el marchitamiento por *Fusarium* en cultivos de banano, que tiene un papel tan importante en la economía agrícola del país. Aunque existen otros métodos para determinar in vitro la susceptibilidad de hongos ante agentes antifúngicos, como el método de difusión o la inhibición de germinación de conidias o esporas, el primero es un método

generalizado en hongos de importancia clínica y requiere de ajustes cuando el hongo no crece de manera radial, y el último es complicado, requiere de largos tiempos de trabajo y esfuerzo. Optando por la técnica de microdilución en caldo, es necesario ajustar y estandarizar la metodología para el hongo de estudio, medios de cultivo recomendados, antifúngico de referencia, entre otros, para que pueda utilizarse como un método estándar en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la implementación del Método de Referencia Estándar CLSI M38-A2 para la determinación de la susceptibilidad antifúngica de *F. oxysporum* mediante la técnica de microdiluciones se seleccionó un fungicida ampliamente usado y recomendado para el control de enfermedades causadas por hongos: BÉLICO (3).

Cepa fúngica

La cepa de *F. oxysporum* fue obtenida del semillero de hongos de la Universidad CES y donada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, repicada en agar PDA en los laboratorios de Ciencias Básicas de la Universidad CES, sede Poblado.

Los siguientes pasos corresponden al procedimiento descrito por la norma M38-A2, con los respectivos ajustes para que pueda aplicarse y estandarizarse para *F. oxysporum*

Preparación de la solución de trabajo del antifúngico

El fungicida de referencia a utilizar (BÉLICO) fue preparado como solución de almacenamiento a una concentración inicial de 4000 ppm, y posteriormente a 1000 ppm,

2000 ppm, 3000 ppm, 5000 ppm, 6000 ppm, 7000 ppm, 8000 ppm, 9000 ppm, y 10000 ppm, para los ensayos de análisis del comportamiento del hongo cuando se cambia esta variable. La solución fue preparada volumétricamente, y cuidadosamente almacenada a 20°C (4).

Procedimiento

Para la implementación de las pruebas de sensibilidad según la Norma Estándar M38-A2 se siguieron todos los pasos del procedimiento descrito, utilizando como medio de cultivo caldo Sabouraud-Glucosa 2% (4), realizando los ajustes necesarios en la preparación del inóculo, tiempo de incubación y la longitud de onda (λ) de lectura con el fin de cumplir con la Norma. El procedimiento se realizó como se indica a continuación:

Preparación del inóculo

Se realizó un raspado de superficie de colonia de *F. oxysporum* en un mortero estéril. El micelio fue macerado en seco y suspendido en caldo Sabouraud-Glucosa 2%, y esto posteriormente fue filtrado utilizando una malla 50, con el fin de obtener fragmentos miceliales homogéneos. La densidad fue ajustada añadiendo caldo Sabouraud-Glucosa 2%, leyendo repetidamente con un espectrofotómetro hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,1 a una longitud de onda (λ) de 600 nm. Sin realizar ajustes, este procedimiento permite producir una suspensión de fragmentos miceliales de concentración aproximada de 4×10^8 fragmentos de micelio/mL. Con los ajustes, se permitió llegar a una concentración final de 2×10^4 fragmentos de micelio/mL de suspensión, que significa que la solución final de fragmentos miceliales en el microplato es 2 veces menos concentrada.

Curva de crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en microplatos

Para entender el comportamiento de *F. oxysporum* en suspensión en los microplatos, se realizó seguimiento de su crecimiento durante 15 días de cultivo, con un inóculo de 2×10^4 fragmentos de micelio/mL y a una λ de 600 nm, con 12 réplicas. Se depositaron 50 μ L del inóculo, 50 μ L de caldo Sabouraud y 50 μ L de agua en cada pozo, y se incubaron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) en condiciones de oscuridad, realizando mediciones diarias del crecimiento micelial a una λ de 600 nm en un espectrofotómetro para platos Biotek (5).

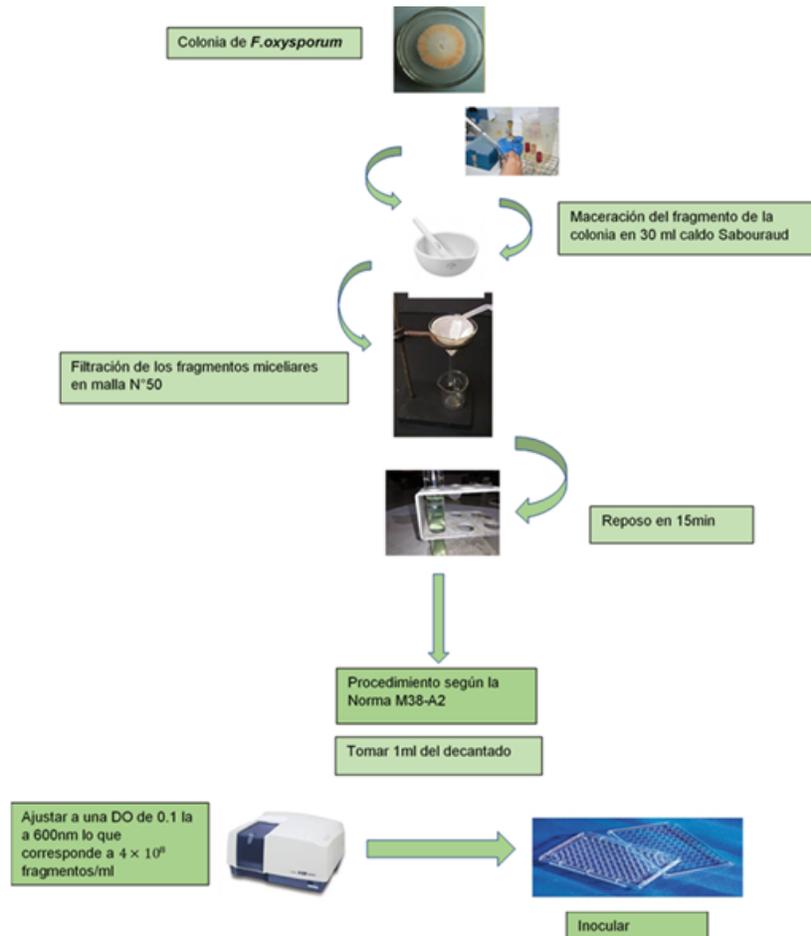


Figura 1. Estandarización de la técnica de Microdilución Estándar según la norma M38-A2 para evaluar la susceptibilidad a antifúngicos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*.

Preparación del agente antifúngico diluido

Las concentraciones evaluadas fueron seleccionadas según los datos reportados por el FRAC (Fungicide Resistance Action Comitee), donde se especifica que para los métodos de monitoreo se requiere de un mínimo de 2 concentraciones diferentes, preferiblemente entre 4 y 5. En estas concentraciones se debería incluir los valores de EC50 y EC95 (6). Los rangos de concentración evaluados del agente antifúngico fueron 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000 y 0 ppm (6,7). A partir de una solución de 4000 ppm del antifúngico, se realizaron diluciones seriadas en el medio de cultivo. Finalmente, el microplato estuvo listo para ser inoculado y realizar las evaluaciones correspondientes, siendo la columna 1 la dilución del agente antifúngico más concentrada y la columna 12 la más diluida.

Inoculación del medio de cultivo

La suspensión del inóculo ajustada en el espectrofotómetro a una DO de 0.1 nm de absorbancia (solución de trabajo), fue utilizada para inocular el microplato, depositando 100 μ L del inóculo a cada pozo que no fuese de control negativo. Este procedimiento generó una dilución 1:100 de cada concentración de antifúngico respecto a las soluciones stock y una dilución 1:2 del inóculo respecto a las soluciones de trabajo (figura 1).

Incubación, lectura y análisis

Los microplatos fueron incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 días bajo condiciones de oscuridad. El crecimiento micelial fue medido diariamente a una λ de 600 nm según la Norma Estándar

(2). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro para platos (Biotek®). Cada concentración se evaluó con tres repeticiones, para un microplato, con tres réplicas (2). El porcentaje de crecimiento relativo se determinó mediante la ecuación (Ecuación 1):

Ecuación 1. Porcentaje de crecimiento relativo.

$$\%Crecimiento = \frac{Absorbancia\ con\ el\ antifúngico}{Absorbancia\ sin\ el\ antifúngico\ (control)} \times 100$$

Posteriormente, se realizaron los ensayos para la determinación de la actividad antifúngica, realizando el cálculo del porcentaje de crecimiento para cada concentración del antifúngico, utilizando Ecuación 2, que permite inferir la inhibición lograda:

Ecuación 2. Porcentaje de crecimiento en presencia de antifúngico

$$\% de\ Crecimiento = \frac{Absorbancia\ con\ el\ antifúngico - Absorbancia\ de\ control}{Absorbancia\ de\ control} \times 100$$

RESULTADOS

Se realizó seguimiento al crecimiento de *F. oxysporum* durante 15 días de cultivo, con el fin de determinar el crecimiento del hongo en condiciones de cultivo en suspensión en microplatos y establecer el tiempo adecuado para realizar las mediciones en los ensayos posteriores, realizando lecturas diariamente a una λ de 600 nm, verificando que el tamaño de inóculo (2×10^4 fragmentos de micelio/mL) funcionaba.

Como puede observarse en la curva de crecimiento del hongo (figura 2), no es apreciable la fase de latencia, se presenta una fase exponencial desde el primer día hasta el día 8 y una leve fase estacionaria a partir del día 9 al 12. También se puede observar como a partir del día 5 de crecimiento la absorbancia alcanza valores superiores a 1 debido a la presencia de fragmentos miceliales de gran tamaño que pueden dificultar la lectura y que deben ser desagregados antes de cada medición (8,9).

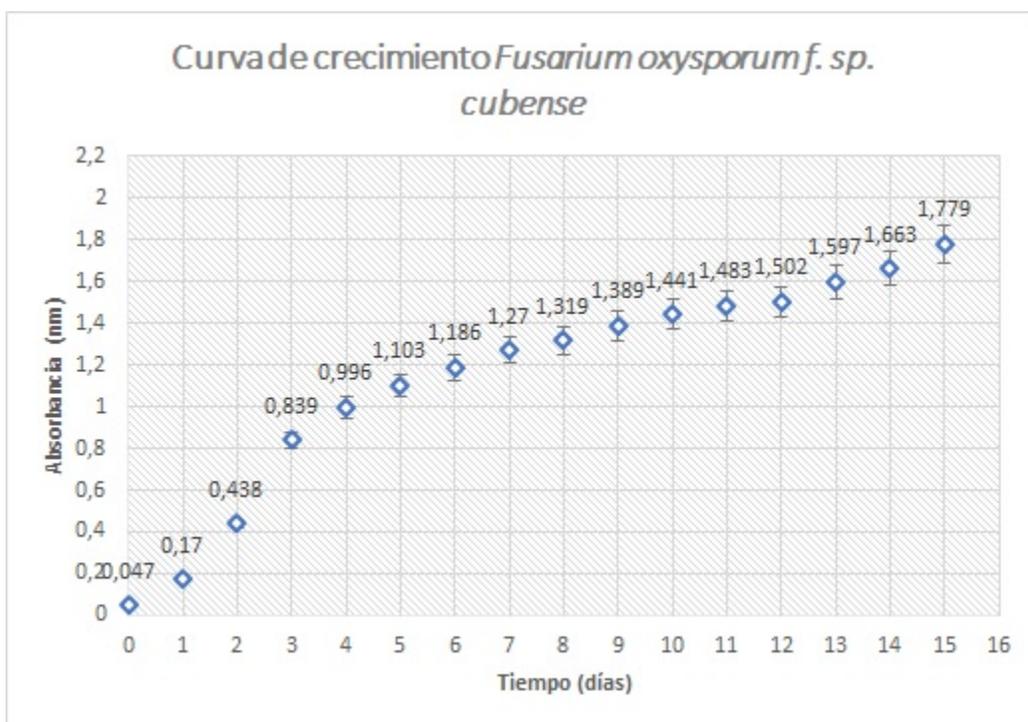


Figura 2. Curva de crecimiento *Foc*

Por lo anterior, se seleccionó el día 4 para la lectura de actividad del antifúngico, debido a que aun se encuentra en una fase exponencial de crecimiento y la absorbancia no ha aumentado por encima de 1 por la presencia de agregados de micelio, y que luego de este día, puede considerarse que hay un periodo estable durante el cual los cambios en la absorbancia no son mayores (4, 10, 11).

Continuando con el análisis de los cambios iniciales, se realizó la determinación del porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* bajo el antifúngico de referencia seleccionado, a diferentes concentraciones: 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 0 ppm, realizando un seguimiento por 15 días.

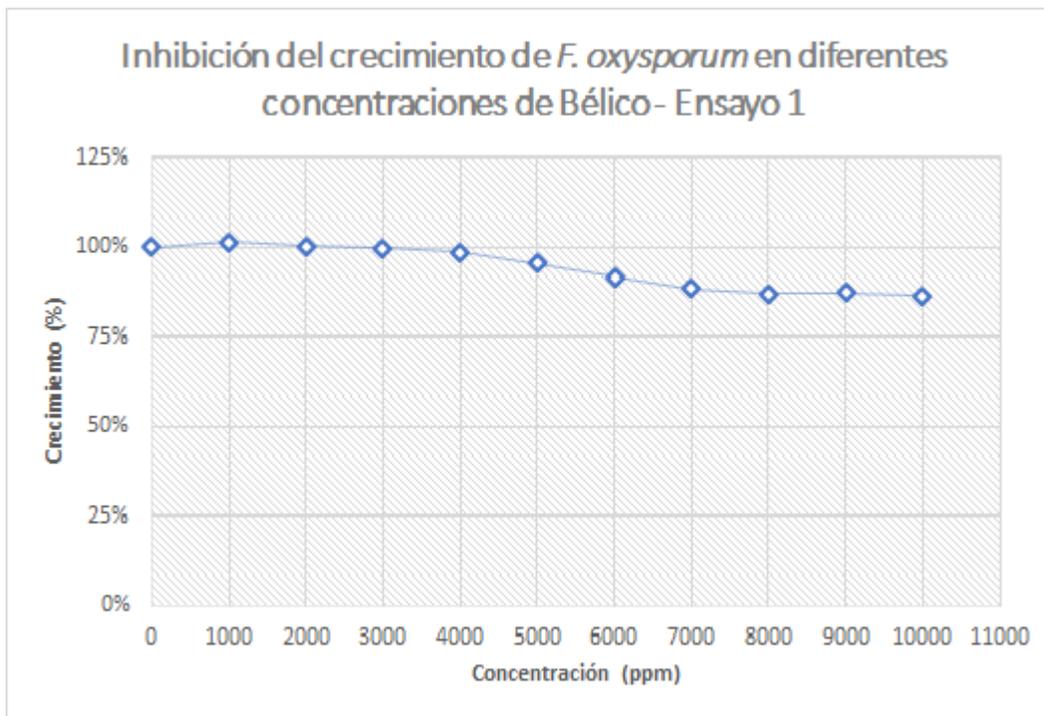


Figura 3. Gráfico de inhibición del crecimiento de *Foc* ante el fungicida Bético, ensayo 1.

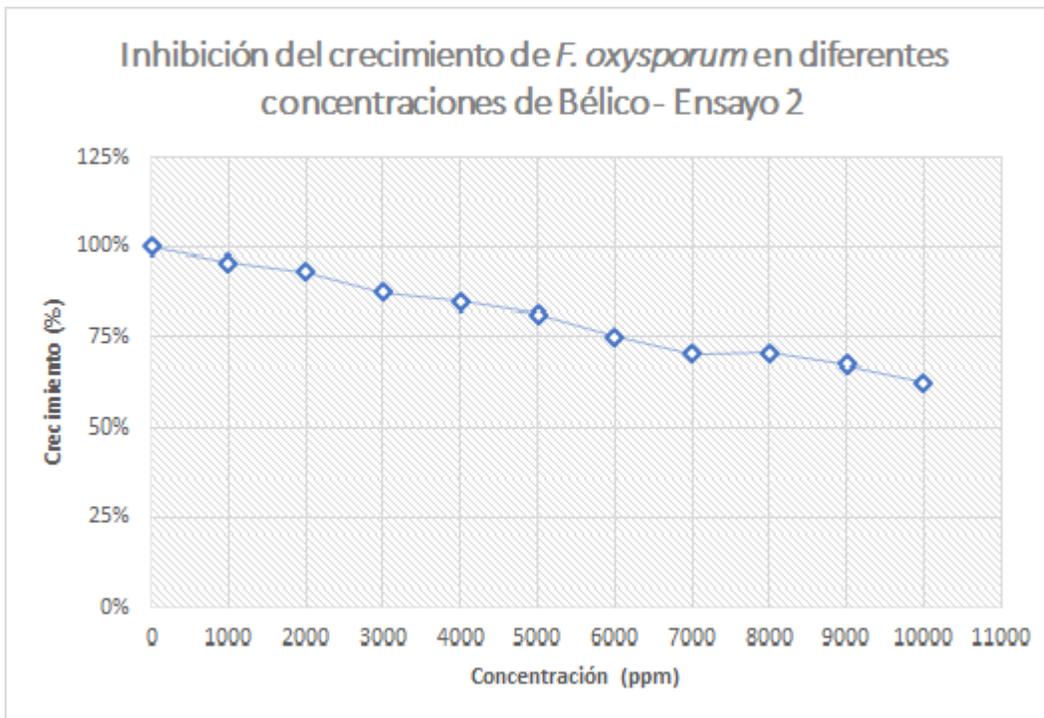


Figura 4co de inhibición del crecimiento de *Foc* ante el fungicida Bécico, ensayo 2.

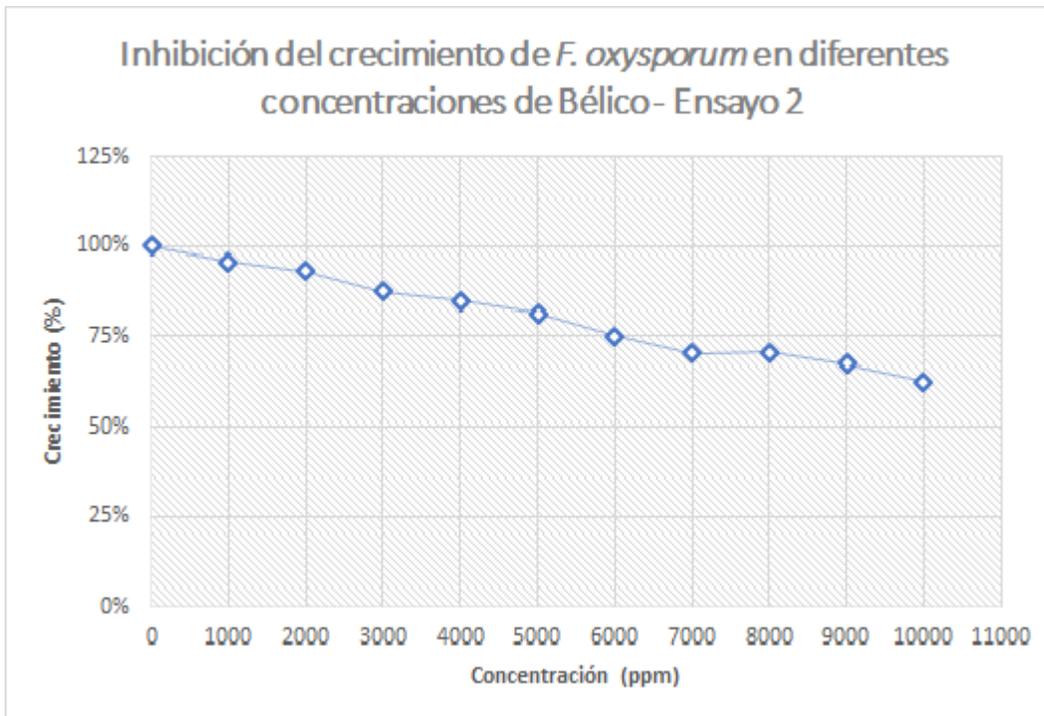


Figura 5. co de inhibición del crecimiento de *Foc* ante el fungicida Bécico, ensayo 3.

Para complementar los resultados obtenidos y realizar un análisis completo, se comparó la curva de crecimiento en ausencia de antifúngico, y la curva de crecimiento obtenida en presencia de antifúngico. Se compararon también los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados, para observar si el comportamiento del hongo es consistente y las variables o condiciones que pueden alterar el crecimiento normal.

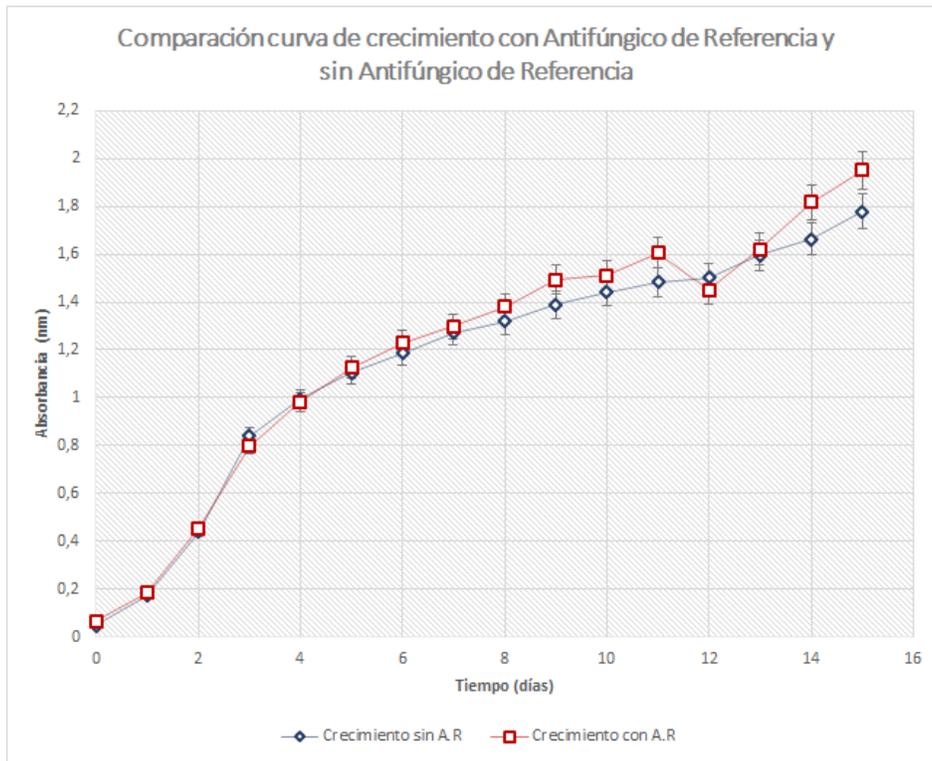


Figura 6. Crecimiento de *Foc* con fungicida Bético y sin fungicida Bético.

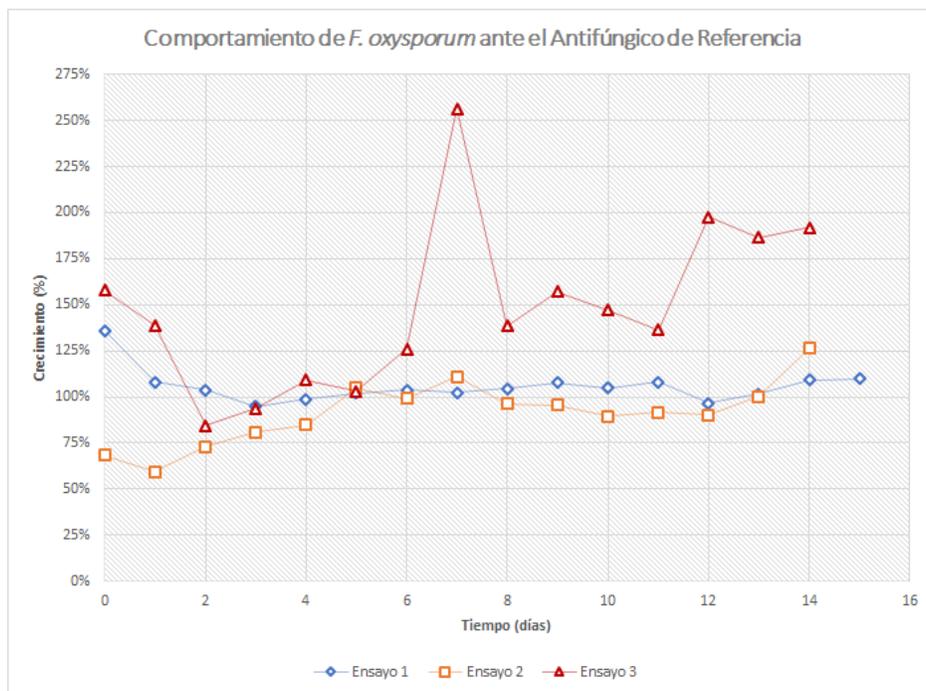


Figura 7. Comportamiento de *Foc* en presencia de Bético (4000 ppm), durante 15 días de crecimiento.

DISCUSIÓN

Se realizaron ensayos de actividad utilizando la técnica de microdilución, ajustándola a la norma M38-A2, ya que es necesario estandarizar todas las condiciones para llevar a cabo una medición correcta y obtener resultados reproducibles, teniendo en cuenta factores como el medio utilizado, el comportamiento del hongo en el tiempo, el inóculo, entre otros, como lo indica Espinel-Ingroff et al. (2009) (5).

Las pruebas de sensibilidad antifúngica de hongos filamentosos son complejas, por características de estos hongos como su crecimiento, el pH, temperatura o la composición del medio (5,12).

En el caldo de cultivo Sabouraud-Glucosa 2%, con una cantidad de inóculo en el pozo del microplato de 2×10^4 era posible medir el micelio de *Fusarium oxysporum* al día 4 de cultivo, que presentó una fase exponencial desde el primer día hasta el día 8 y una leve fase

estacionaria a partir del día 9 al 12. Se puede afirmar que los aglomerados de micelio que se generaron, fueron la principal interferencia en las lecturas (2, 5).

El método de microdilución para el análisis de sensibilidad a agentes antifúngicos ofrece como ventaja principal ante otros métodos, como la inhibición de la germinación de ascosporas, la precisión de los resultados, los cuales se basan en la medición mediante un espectrofotómetro, que evita la subjetividad del juicio de si hubo o no inhibición, y en qué grado (8).

Otra de las ventajas que representa este método es que permite un proceso de análisis en un tiempo corto, ya que se pueden tener hasta 96 muestras por microplato.

No obstante, y como se observa en los resultados de esta investigación, este método puede presentar errores, principalmente debido a la no homogeneización de la suspensión antes de cada lectura, y la omisión de análisis previos a los ensayos para predecir y estimar los agentes y recursos necesarios para lograr la estandarización del método.

Se esperaba que el método fuese preciso, rápido y reproducible, con ventajas sustanciales sobre métodos como la difusión en agar y la inhibición de la germinación de ascosporas, pues se pretendía estandarizar el método para la búsqueda de sensibilidad de *F. oxysporum* a diferentes antifúngicos. Implementando el método de microdilución, se pretendía demostrar que, como ya se ha hecho con otros hongos (13), en *F. oxysporum* también sería una herramienta que permite manejar grandes cantidades de ensayos, libres de contaminación y minimizando el tiempo de proceso, sin haber considerado y evaluado previamente factores como la compatibilidad del antifúngico de referencia con el medio de crecimiento, si su solubilidad y estabilidad se veía afectada por compuestos presentes en el medio, o el típico

perfil de susceptibilidad a fungicidas de *Fusarium oxysporum*, que es la resistencia a la mayoría de agentes.

En las figuras (figuras 3, 4 y 5) se aprecia la poca capacidad inhibitoria que posee el fungicida utilizado contra *Fusarium oxysporum*, tanto así que a una concentración de 10000 ppm lo máximo que logró disminuirse el crecimiento fue hasta alrededor de 62%.

La figura 6 muestra como el crecimiento de hongo llegó a ser aún mayor en presencia del antifúngico BÉLICO, a una concentración de 4000 ppm, que en su ausencia. Aunque mayores concentraciones en los ensayos posteriores mostraron leve efectividad, puede concluirse que *Fusarium oxysporum* es resistente al antifúngico seleccionado.

Como análisis final, en la figura 7 se exponen las amplias diferencias entre repeticiones en el comportamiento del hongo ante el fungicida. En algunos días de medición, se observa un aumento en el crecimiento y al día siguiente, disminución, y luego aumento nuevamente. Este comportamiento se atribuye a interferencias en la medición. Sin embargo, aunque el porcentaje de crecimiento siguiera un patrón común, la desviación estándar y coeficiente de variación de los datos indican que el comportamiento del hongo no es consistente y los resultados no son reproducibles.

La Norma de Referencia Estándar CLSI M38-A2 para el estudio de susceptibilidad de *F. oxysporum* a antifúngicos no pudo implementarse ni estandarizarse.

Se recomienda en un nuevo estudio evaluar preliminarmente la actividad antifúngica contra *F. oxysporum* y la compatibilidad del agente fungicida con el medio en caja de Petri, realizando siembra a profundidad e inoculando el plato a la misma concentración (fragmentos miceliales) a utilizar para el método de microdilución, realizar un pozo donde se pueda depositar el antifúngico a evaluar y llevar un control negativo de inhibición, incubar a las

condiciones necesarias y analizar los resultados antes de la estandarización del método de microdilución.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su mayor gratitud a todos los que directa e indirectamente han contribuido al desarrollo de este trabajo. A José Estrada, por su acompañamiento y asesoría en todo el proceso. Al programa de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES y sus docentes.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. García-Bastidas, Fernando & Pachacama, Silvia & Jarrín, David & Iza Arteaga, Mario & Ayala-Vasquez, Mariluz & Ortiz, Hernan & Dix, Oscar & Echegaray, Judith & Menendez, Danilo & Bartolini, Ida & Montoya, Camilo & Zeballos, Gerodana. (2020). Guía Andina Para el Diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical (RT4) *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense (syn. *Fusarium odoratissimum*) Agente Causal de la Marchitez por Fusarium en Musáceas (plátanos y bananos).
2. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009;28(16):1–35.
3. Belico500sc__. (s. f.). Recuperado 23 de mayo de 2022, de http://www.ghcia.com.co/plm/source/productos/2532_58_160.htm
4. Cantón E, Msrtin E, Espinel-ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. 2007;15:1.
5. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J. Updates in antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Current Fungal Infection Reports* [Internet]. 3:133–41. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12281-009-0017-7>

6. Madrigal R, Arroyo T, Astua T, Monreri S. List of Monitoring Methods. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2012;1:1–3.
7. FRAC. Estrategias generales de manejo de resistencia en el cultivo de banano. Fungicide Resistance Action Committee. 2011;1:1–13.
8. Peláez J, David LE, Brito Díaz, Judith T, Sánchez Castañeda, Antonio D, Rodríguez E, Arango R. Use of a micro title plate dilution assay to measure activity of antifungal compound against *Mycosphaerella Fijiensis*. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de la Universidad Nacional Medellín*. 2006;59(2):3425–33.
9. Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, Verweij PE. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2001 Feb;39(2):478–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=87762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Buchta V, Otčenášek M. Factors Affecting the Results of a Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing In Vitro. *Zentralblatt für Bakteriologie* [Internet]. 1996 Mar [cited 2022 May 02];283(3):375–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0934884096800739>
11. Martos AI, Martín-Mazuelos E, Romero A, Serrano C, González T, Almeida C, et al. Evaluation of disk diffusion method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. *Diagnostic microbiology and infectious disease* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012 Apr 3 [cited 2022 May 02]; In Press:19–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480568>
12. Gooday GW. The dynamics of hyphal growth. *Mycological Research* [Internet]. British Mycological Society; 1995 Apr [cited 2022 May 04];99(4):385–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756209806345>
13. Broekaert W, Terras F, Cammue B, Vander- leyden J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS microbiology letters*. 1990;69:55–9.