

Estrella Martín-Mazuelos
Emilia Cantón Lacasa
Ana Espinel-Ingroff

16.1. Fundamento

A pesar de existir documentos que estandarizan los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, estos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica.

En lo que respecta a las levaduras (*Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*), el documento M27-A3 (Capítulo 15a) se acepta como el método de referencia para los estudios de sensibilidad *in vitro* a diferentes antifúngicos, pero tiene una serie de limitaciones:

1. No es un método adecuado para detectar la resistencia a anfotericina B, por ello se debe seguir buscando un método que discrimine mejor estas resistencias.
2. El medio RPMI 1640 presenta problemas para el crecimiento de *C. neoformans* por lo que se ha propuesto el medio yeast nitrogen base (YNB) [1] para la determinación de la CMI de los antifúngicos para esta levadura.

Aunque el método M27-A3 se considera el método de referencia, no es el más adecuado para todos los hongos ni para ser utilizado de rutina en los laboratorios de Microbiología clínica [2,3]. Por ello, se siguen evaluando métodos alternativos al del CLSI; entre los comercializados, se dispone tanto de métodos colorimétricos como no colorimétricos.

16.2. Métodos colorimétricos

Son métodos basados en el M27-A2 [1] que incorporan un indicador redox en el medio de cultivo que cambia de color cuando existe crecimiento fúngico en el pocillo, facilitando la lectura visual del mismo.

16.2.1. Sensititre YeastOne®

Es un método cuantitativo comercializado por Sensititre Alamar Yeast One (Westlake, EE.UU.) y suministrado en España por Izasa S.A.

Fundamento

Se basa en el método de microdilución del documento M27-A2 del CLSI al que se le ha añadido un indicador de crecimiento de oxido-reducción (azul Alamar). Tiene la ventaja de que la lectura es más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules. Sin embargo, con los azoles sigue habiendo problemas de lectura ya que, debido al efecto *trailing*, el cambio de color no es tan evidente y, en ocasiones, pasa de rosa (crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento) [2-4]. Según nuestra experiencia y la de otros autores [2-5], el método muestra una buena correlación (70-100%) con el método de referencia (M27-A2), así como una buena reproducibilidad [5], por ello la Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA) ha aceptado este método como buena alternativa al método de referencia, para estudios de sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp, a fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina [5]. Un estudio de 2005 ha demostrado también una muy buena correlación (> 90%) y reproducibilidad con el método de referencia para los nuevos antifúngicos (voriconazol, posaconazol, ravuconazol y caspofungina) y capaz de detectar las cepas con sensibilidad disminuida a caspofungina [6]. El método no es útil para la detección de cepas resistentes a anfotericina B, probablemente por la utilización del medio líquido RPMI 1640 [1-3]. Se considera una alternativa que podría introducirse de rutina en el laboratorio de microbiología clínica para los estudios de sensibilidad *in vitro* de las levaduras, aunque hay que tener en cuenta que la correlación de este método con el de referencia es menor para las asociaciones de fluconazol con *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Para *Cryptococcus neoformans* éste método presenta baja correlación (70%) y problemas de crecimiento de algunas cepas [7].

Material

Placas microtiter de 96 pocillos con el azul Alamar incorporado con concentraciones dobles seriadas de antifúngicos deshidratados: anfotericina B (0,008-16 µg/ml); fluconazol (0,125-256 µg/ml); itraconazol y voriconazol (0,008-16 µg/ml); ketocanazol (0,008-16 µg/ml) y 5-fluorocitosina (0,03-64 µg/ml). El control de crecimiento está incluido en el primer pocillo de la primera fila (1 A). Sólo hay seis filas ocupadas de las ocho filas de la placa.

Medio de cultivo

RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato cálcico y tamponado con MOPS (0,164 M) ajustado a pH 7±0,1 (el mismo que el método de referencia), pero suplementado con 1,5% de glucosa. Viene preparado en tubos de tapón de rosca con 11 ml de medio.

Preparación del inóculo

Tocar con el asa de cultivo aproximadamente cinco colonias de ≥1mm en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), de 24 h de crecimiento para *Candida* spp. y de 48 h para *C. neoformans*. Resuspender las colonias en un tubo de agua destilada, agitar y ajustar con un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm) a una densidad óptica equivalente al 0,5 de la escala McFarland (1-5x10⁶ UFC/ml). Inocular 20 µl de esta suspensión en el tubo con 11 ml de medio de cultivo (dilución de trabajo: 1,5-8x10³ UFC/ml).

Rehidratación del panel

El panel se rehidrata dispensando 100 µl de la suspensión del inóculo en cada pocillo; bien de forma manual, bien automáticamente con el autoinoculador Sensititre.

Incubación

Los paneles se sellan con papel autoadhesivo y se incuban en aerobiosis (nunca en atmósfera de CO₂) a 35 °C, durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*. Algunas cepas de *C. neoformans* no crecen en este medio.

Control del inóculo

Del mismo tubo de RPMI con el que se inoculan los paneles se siembran 10 µl en una placa de SDA y se incuban a 35 °C. A las 24 h (*Candida* spp.) ó 48 h (*C. neoformans*) se cuenta el número de UFC (deben crecer entre 15-80 colonias).

Lectura

Antes de proceder a la lectura hay que comprobar que el pocillo control de crecimiento ha virado a rosa; en caso contrario, la incubación debe prolongarse hasta su cambio de color. La CMI de los azoles y la 5-fluorocitosina se lee a las 24 h de incubación para *Candida* spp. y a las 48 h para *C. neoformans*. Sin embargo, la CMI de la anfotericina B debe leerse a las 48 h de incubación para *Candida* spp. y a las 72 h para *C. neoformans*. La CMI de anfotericina B es la concentración más baja de antifúngico que no muestra cambio de color; es decir, el primer pocillo azul. En los azoles y en la 5-fluorocitosina no hay siempre un paso de rosa a azul, sino que puede aparecer un color intermedio púrpura (debido al efecto *trailing*); en este caso la CMI es la concentración del primer pocillo púrpura (Figuras 16.1 y 16.2).

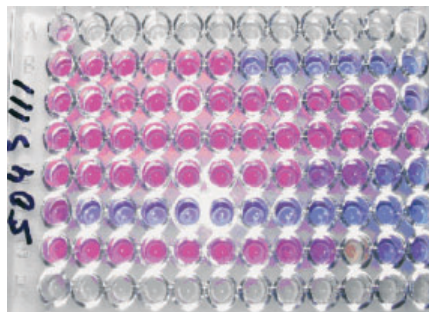


Figura 16.1. Panel Sensititre Yeast One a las 24 h de incubación.

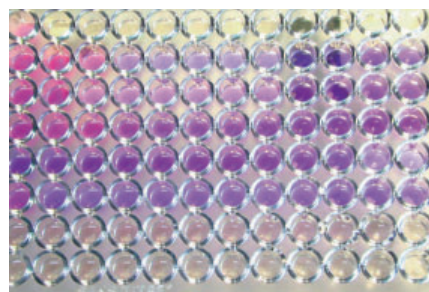


Figura 16.2. Panel Sensititre Yeast One a las 24 h de incubación con efecto *trailing* en los antifúngicos azólicos.

Cepas Control de Calidad

Para asegurar la validez de los resultados, en cada lote debe utilizarse las cepas de control de calidad recomendadas por el documento M27-A2 del CLSI: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 (Capítulo 15).

Atención:

- En la lectura de la CMI no debe tenerse en cuenta la turbidez de los pocillos.
- La lectura de la CMI se hará siempre que el pocillo de crecimiento muestre cambio de color a rosa. *C. parapsilosis* y algunas cepas de *C. glabrata* tardan en crecer más de 24 h
- La CMI de la anfotericina B se lee a las 48 h de incubación para *Candida* spp. y a las 72 h para *Cryptococcus neoformans*
- Se considera un sistema alternativo válido, aprobado por la FDA (USA), para el estudio de sensibilidad "in vitro" de cepas de *Candida* spp. a itraconazol, fluconazol y voriconazol.
- Según los datos publicados hasta la fecha, parece un buen método para el estudio de sensibilidad "in vitro" de *Candida* spp. a los nuevos antifúngicos ravuconazol, posaconazol y equinocandinas.

16.2.2. Fungitest®

Es otro método colorimétrico fabricado por Sanofi Diagnostic Pasteur (Paris, Francia) y comercializado en España por Bio-Rad. Diversos estudios publicados en la literatura han demostrado buena correlación con el método de microdilución del CLSI (M27-A2) (86-100%) con distintas especies de *Candida* [8].

Fundamento

Está basado en el método de microdilución del CLSI, incluye 6 antifúngicos cada uno de ellos a dos concentraciones críticas: anfotericina B (2 y 8 µg/ml), 5-fluorocitosina (2 y 32 µg/ml), miconazol (0,5 y 8 µg/ml), ketoconazol (0,5 y 4 µg/ml), itraconazol (0,5 y 4 µg/ml) y fluconazol (8 y 64 µg/ml).

Material

La prueba se presenta en forma de galería con 16 pocillos: 2 controles de crecimiento, 12 con los antifúngicos deshidratados y 2 pocillos controles de esterilidad.

Medio de cultivo

El medio utilizado es también RPMI 1640 tamponado y suplementado con glucosa. El medio contiene un indicador de oxido-reducción que cambia su color de azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento).

Preparación del inóculo

A partir de dos colonias de levaduras, en un cultivo de 24 h en SDA, se realiza una suspensión en 3 ml de agua destilada para obtener una turbidez equivalente al 1 de McFarland. A partir de ella, se hace una dilución 1/20 (diluyendo 100 µl de esta suspensión en 1,9 ml de agua destilada estéril). 20 µl de esta suspensión se vuelven a diluir en 3 ml de RPMI para obtener un inóculo final de 1×10^3 UFC/ml.

Rehidratación del panel

Cada pocillo se inocula con 100 µl de la suspensión de RPMI conteniendo el inóculo y se sellan las placas.

Incubación

Los paneles se incuban a 35 °C durante 48 h para *Candida* spp. y 72 h para *C. neoformans*. El crecimiento se aprecia por un cambio del color azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento) (Figura 16.3).



Figura 16.3. Galería de Fungitest.

Interpretación de la lectura

- Ausencia de crecimiento en los dos pocillos: Sensible.
- Crecimiento en ambos pocillos: Resistente.
- Crecimiento en el pocillo de menor concentración: Intermedio.

Cepas Control de Calidad

Las recomendadas por el documento M27-A del CLSI (Capítulo 15).

Problemas y ventajas:

- Las concentraciones de anfotericina B e itraconazol son demasiado elevadas.
- En los azoles, la correlación con el M27-A2 no es buena para las cepas resistentes [2,8].
- Es un método fácil y cómodo pero, para ser utilizado de rutina, se tendrían que revisar las concentraciones críticas en relación con la normativa del CLSI.

16.3. Otros métodos basados en el M27-A

16.3.1. ATB Fungus®

Es un sistema fabricado y comercializado por bioMérieux (Francia). Este método podría ser aplicable a la rutina de un laboratorio de microbiología pero no incorpora antifúngicos tan importantes en la clínica, como el fluconazol y el itraconazol, por lo que su utilidad en las micosis sistémicas es limitada [9]. Por otra parte, la correlación con otros métodos es aceptable para los azoles y buena para anfotericina B, nistatina y 5-fluorocitosina.

Fundamento

Se basa en el método del CLSI, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B y 5-fluorocitosina y dos concentraciones críticas para el resto de los antifúngicos.

Material

Galería de 16 pocillos con los antifúngicos deshidratados a distintas concentraciones: 5-fluorocitosina (0,25-128 µg/ml), anfotericina B (1-8 µg/ml), nistatina (4 y 8 µg/ml), ketoconazol, miconazol y econazol (1 y 8 µg/ml).

Medio de cultivo

ATBF medium [Yeast Nitrogen Base (YNB) 6,7 g/l, con 1% de glucosa, 1,5 g/l de asparagina y 1,5 g/l de agar], pH 5,4 - 5,8.

Inóculo

A partir de un cultivo de 24 h en SDA, se hace una suspensión en agua destilada equivalente al 2 de McFarland. Transferir 100 µl de esta suspensión a una ampolla de ATBF (7 ml). De esta suspensión, se inoculan 135 µl en cada pocillo.

Incubación

A 35 °C en aerobiosis durante 48 h.

Lectura

Para anfotericina B y 5-fluorocitosina la CMI se lee en el pocillo donde se observa inhibición total del crecimiento. Para los otros antifúngicos sólo se puede establecer la categoría clínica (sensible, intermedio o resistente) ya que únicamente utiliza dos concentraciones críticas.

- Ausencia de crecimiento en ambas concentraciones: Sensible.
- Crecimiento en la concentración más baja: Intermedio.
- Crecimiento en las dos concentraciones: Resistente.

16.3.2. ATB Fungus 2®

Recientemente ha sido comercializado por bioMérieux una modificación del método ATB Fungus, que introduce fluconazol e itraconazol. No existen datos publicados en la literatura que establezcan la correlación de este método con el de microdilución del CLSI. Nosotros, en datos no publicados hemos obtenido una correlación global del 71,4% en distintas especies de *Candida*, siendo ésta alta para anfotericina B y 5 fluorocitosina (92% y 85%, respectivamente), moderada para fluconazol (65%) y baja para itraconazol (44%).

Fundamento

Se basa en el método del CLSI y utiliza diluciones seriadas para anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol.

Material

Galería de 16 pocillos con los antifúngicos deshidratados a distintas concentraciones: 5-fluorocitosina (0,25-128 µg/ml), anfotericina B (1-8 µg/ml), fluconazol (0,25-128 µg/ml) e itraconazol (0,125- 4 µg/ml).

Medio de cultivo

ATBF medium [Yeast Nitrogen Base (YNB) 6,7 g/l, con 1% de glucosa, 1,5 g/l de asparagina, y 1,5 g/l de agar], pH 6,5-6,8.

Inóculo

A partir de un cultivo de no más de 4 días en SDA, se hace una suspensión en agua destilada equivalente al 2 de McFarland. Transferir 20 µl de esta suspensión a una ampolla de ATBF (7 ml). De esta suspensión (aproximadamente 3x10³ UFC/ml) se inoculan 135 µl en cada pocillo.

Incubación

A 35 °C en aerobiosis, en cámara húmeda durante 24 h para *Candida* spp. y 48 h para *Cryptococcus neoformans*.

Lectura

Para anfotericina B la CMI se lee en el pocillo donde se observa inhibición total del crecimiento. Para los otros antifúngicos la lectura se hace en el pocillo donde se observa una marcada reducción del crecimiento en comparación con el control de crecimiento (Figura 16.4).

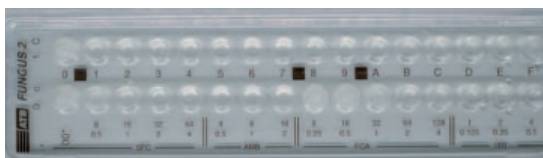


Figura 16.4. Galería ATB Fungus 2.

Problemas y ventajas:

- Método fácil, y asequible a cualquier laboratorio clínico.
- Buena correlación con el método M27-A2, para anfotericina y 5-fluorocitosina, pero limitada por itraconazol y fluconazol.
- No tiene incorporado el voriconazol.
- Hay pocos estudios de correlación con el documento CLSI.

16.4. Métodos basados en la difusión en agar

16.4.1. Etest®

Es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por AB biodisk (Solna, Suecia) y distribuido en España por Izasa S.A.

Fundamento

Las tiras de Etest son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35 °C durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest.

La correlación con el método M27-A2 varía entre el 60 y el 100%, según los estudios [2,10-13] pudiendo depender de varios factores mencionados abajo.

- Medio de cultivo:** mejor correlación en los medios de agar casitona y agar RPMI 1640 con 2% de glucosa y agar Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno que en el medio RPMI sin glucosa [10,12].
- Combinación especie/antifúngico:** correlación más baja para *C. glabrata* - fluconazol/voriconazol, *C. tropicalis* - fluconazol e itraconazol, y *C. neoformans* - anfotericina B [10,13].
- Tiempo de incubación:** mejor correlación con lectura a las 24 h que a las 48 h [2,3,12], excepto para *C. neoformans* que la mejor correlación se consigue a las 48 h [13].
- Antifúngico:** la correlación es más baja en los azoles debido a que la lectura es más problemática por la aparición de doble halo. En nuestros trabajos [10 y datos no publicados], hemos observado una correlación global para voriconazol del 91%, para fluconazol del 74,6% y del 61,7% para itraconazol. Las asociaciones *C. glabrata*-fluconazol/voriconazol y *C. parapsilosis*-itraconazol son las que presentan menor correlación (66,6%, 83% y 42,5%, respectivamente), el resto de las especies tienen una correlación por encima del 90% para el voriconazol, del 75% para fluconazol y por encima del 60% para el itraconazol. En el caso de *C. neoformans*, la correlación para fluconazol y 5-fluorocitosina es del 81 y 90%, respectivamente; sin embargo, para itraconazol, la correlación es inferior al 60% [13].

Nuestros resultados [10] y los de otros autores [2], sugieren que éste método puede ser útil de rutina sólo para anfotericina B con *Candida* spp, pero es poco útil para los azoles; en el caso de *C. neoformans*, se puede utilizar con 5-fluorocitosina y fluconazol [2,13].

Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B usando el medio RPMI 1640 suplementado con un 2% de glucosa tanto para *Candida* spp. como para *C. neoformans* cambiando los tiempos de incubación (24 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*).

Medio de cultivo

RPMI 1640 + MOPS (0,164 M), a pH 7, adicionado con un 2% de glucosa y 1,5% de agar (Angus Biochemicals, Niagara Falls, NY, EE.UU.) suministrado en España por Izasa S.A

Inóculo

Para *Candida* spp. preparar una suspensión al 0,5 McFarland en solución salina (0,85% de ClNa) a partir de un cultivo de 24 h en SDA. Para *C. neoformans*, preparar una suspensión al 1 McFarland en solución salina a partir de un cultivo de 48-72 h en SDA.

Inoculación

A partir de estas suspensiones, inocular las placas de agar con una torunda sembrando en tres direcciones. Dejar secar 10-15 min para que se absorba el exceso del inóculo. Aplicar las tiras de Etest sobre la superficie del agar, bien manualmente o con el aplicador suministrado por la casa comercial. Colocar 5 tiras si la placa es de 14 mm y 2 si es de 9 mm, situando el extremo de mayor concentración del antifúngico hacia la parte exterior de la placa (Figura 16.5).

Incubación

A 35 °C en aerobiosis durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*.

Lectura

En los azoles, la CMI es la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento ($\geq 80\%$) con la tira. En el caso de observarse colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición de los azoles, no hay que tenerlas en cuenta para la determinación de la CMI (Figura 16.6). A veces, con algunos azoles, se observa doble halo de inhibición pero con colonias del mismo tamaño (grandes) en su interior, en cuyo caso debe considerarse resistente. En el caso de observarse triple halo de inhibición, la CMI es la concentración donde las colonias cambian de tamaño (Figura 16.7a). En el caso de la anfotericina B, toda colonia en el interior de la elipse de inhibición, independientemente de su tamaño, debe valorarse para la lectura de la CMI (Figura 16.7b).

16.5. Otros métodos

16.5.1. Dilución en agar

El método clásico de dilución en agar se basa en el uso de placas Yeast Morphology Agar (YMA) (Difco) con distintas concentraciones de fluconazol (0,125-256 $\mu\text{g/ml}$) inoculadas con una suspensión de levaduras e incubadas a 35 °C durante 24 h para *Candida* spp. y 72 h para *C. neoformans*. La CMI se define como la concentración más baja de antifúngico donde se observa una disminución considerable del tamaño de las colonias en comparación con el control del crecimiento (placa sin antifúngico). La correlación con el método de referencia es buena, de tal forma que se puede utilizar como método alternativo para la selección de cepas resistentes a fluconazol, si bien se debería abreviar el protocolo limitando el número de concentraciones a ensayar (1, 2 y 32 $\mu\text{g/ml}$). Este método tiene la ven-

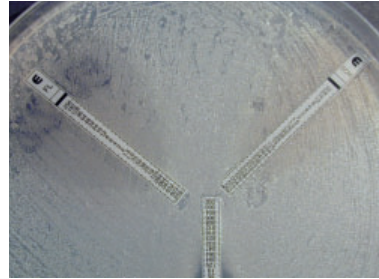


Figura 16.5. Etest: distribución de las tiras.

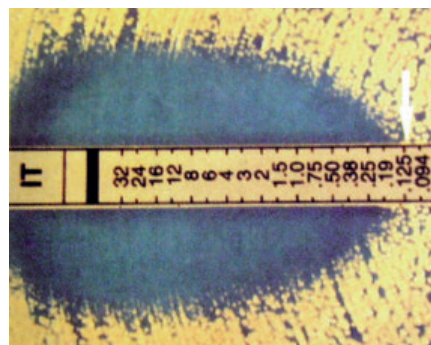


Figura 16.6. Etest: Lectura de la CMI de itraconazol.

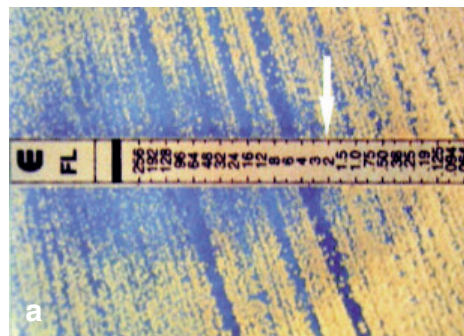


Figura 16.7. Etest: Lectura de la CMI (flecha) en presencia de colonias en el interior de la elipse de inhibición. a: fluconazol; b: anfotericina B.

taja de ser fácil, económico y rápido, y sirve tanto para *Candida* spp. como para *Cryptococcus* spp.; sin embargo, tiene el inconveniente de la subjetividad de su lectura y que, por ahora, sólo es aplicable al fluconazol [3].

El método de dilución en agar también se puede aplicar utilizando otros medios de cultivo, como el CHROMagar *Candida*. El fundamento es el mismo que el anterior, consiste en utilizar placas de CHROMagar con distintas concentraciones de fluconazol (8 y 16 µg/ml), se inoculan con una suspensión de levaduras y se incuban durante 24 h a 35 °C. La CMI es la concentración más baja donde se aprecia una disminución considerable del tamaño de las colonias, en comparación con las del control (placa sin antifúngico). Las ventajas de este método son las mismas que en el anterior y, además, ayuda a la identificación de la especie de *Candida*. La correlación con el método de referencia (M27-A2) es muy buena [3].

Izasa S.A. vende las placas de CHROMagar con 8 mg/l de fluconazol.

16.6. Métodos alternativos para los hongos filamentosos

En el año 2002, el CLSI ha publicado un documento para el estudio de la sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos: el documento M38-A [15]. Este documento expone la utilidad del método para la mayoría de los antifúngicos y hongos filamentosos, y además introduce una modificación respecto al documento anterior M38-P, en la lectura de las CMI de los azoles (100% versus 50% de inhibición del crecimiento), debido a que los hongos filamentosos no presentan efecto *trailing* con este grupo de antifúngicos. Este criterio de inhibición total del crecimiento lo han utilizado algunos autores [2] para la detección de cepas de *Aspergillus* spp. resistentes a itraconazol obteniendo buena correlación con los datos *in vivo* en modelos experimentales de aspergilosis invasora. Sin embargo, con las equinocandinas si aparece este efecto, constituyendo un problema para la interpretación de las CMI a estos antifúngicos, por ello se introdujo un nuevo concepto de lectura para determinar la actividad de las equinocandinas sobre estos hongos, midiendo la concentración mínima eficaz (CME), definiéndola como la menor concentración de antifúngico capaz de alterar la pared celular del hongo, determinada por observación microscópica [16] o macroscópica (cambio morfológico del crecimiento de filamentoso a microcolonias) [17] (ver Capítulo 15).

Al igual que ocurre con las levaduras, el método recomendado por el CLSI para estos hongos es complicado y requiere mucho trabajo para ser utilizado como método de rutina en los laboratorios de Microbiología clínica, por lo que se está intentando buscar otros métodos alternativos. Entre estos métodos tenemos:

16.6.1. Sensititre YeastOne®

Es un método cuantitativo comercializado por Sensititre Alamar Yeast One (Westlake, OH, EE.UU.) para levaduras, pero que también puede ser utilizado en los hongos filamentosos para facilitar la rutina de un laboratorio de microbiología. Datos publicados en la literatura [18,19], muestran que para *Aspergillus* spp., la correlación a las 48 h, con el documento M38-A para la anfotericina B es del 93,4%, para el itraconazol del 90% y para el voriconazol del 82,5%. Además se ha demostrado que es capaz de detectar las cepas resistentes a itraconazol, objetivo fundamental de las pruebas de sensibilidad [18]. El método todavía requiere estudios adicionales para poder utilizarlo en la rutina pero parece un buen método alternativo. Tanto el material que se precisa, como el medio de cultivo utilizado es el mismo que para las levaduras. Las únicas diferencias a tener en cuenta con este método cuando se trabaja con hongos filamentosos son las siguientes:

Inóculo

La preparación del inóculo puede hacerse siguiendo las recomendaciones del M38-A [2].

Incubación

A 35 °C durante 48-72 h.

Lectura

La CMI corresponde a la concentración más baja de antifúngico donde se observa un cambio del color rosa (crecimiento) a azul (ausencia de crecimiento) para todos los antifúngicos (anfotericina B, azoles y 5-fluorocitosina).

16.6.2. Dilución en agar

Es similar al método de dilución en agar utilizado para bacterias y levaduras, descrito anteriormente. Se preparan diluciones seriadas a partir de una dilución 10 veces la concentración final del antifúngico a evaluar y se incorporan al agar fundido. Las placas con el antifúngico se inoculan con suspensiones entre 10^5 - 10^7 UFC/ml. Los medios solidificados de cultivo utilizados son AM#3, RPMI y YNB, pero para algunos autores, el medio RPMI 1640, solidificado y tamponado a pH 7 con MOPS,

es el que mejor correlación muestra con los resultados *in vivo* para itraconazol y *Aspergillus fumigatus* [2]. La incubación se realiza a 28 °C ó 35 °C durante 48-72 h y la lectura de la CMI se hace según el método convencional.

16.6.3. Difusión en discos

Es un método útil para conocer la sensibilidad a la anfotericina B y a los nuevos antifúngicos, como las equinocandinas, de *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos [2,20,21]. En la actualidad, hay pocos estudios con este método, si bien con caspofungina y anfotericina B se ha obtenido mejor correlación con los datos *in vivo* que con el método M38-A [2]. Con voriconazol, los pocos datos publicados de correlación del método de difusión con discos con el documento CLSI M38-A, con *Aspergillus* spp. han sido buenos, usando el medio de cultivo y los criterios del documento M44-A [14] para las levaduras, todas las cepas mostraron halos de inhibición >18 mm, correspondiéndose con cepas con valores de CMI < 0,25 µg/ml por el método de referencia [22]. Son necesarios más estudios con cepas con altos valores de CMI a estos antifúngicos y que correlacionen esto datos con los resultados *in vivo*.

16.6.4. Etest®

Este método es muy útil para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos a los antifúngicos, ya que, al contrario de lo que ocurre en las levaduras, las elipses de inhibición son nítidas y más fáciles de interpretar para los azoles y anfotericina B (Figura 16.8), pero no ocurre lo mismo con las equinocandinas (Figura 16.9). La correlación con el método M38- A es superior al 88% para anfotericina B y voriconazol y alrededor del 70% para itraconazol, cuando la lectura se hace

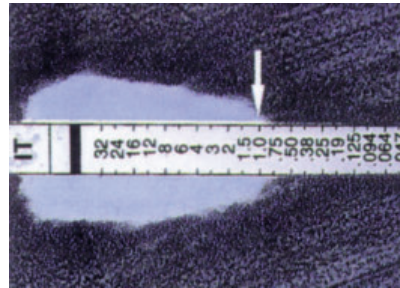


Figura 16.8. Placa de Etest inoculada con *A. fumigatus*. Lectura de la CMI a las 24 h (flecha).

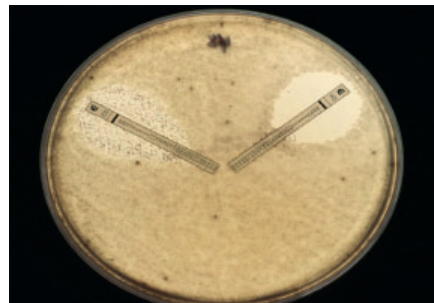


Figura 16.9. Placa de Etest inoculada con *Aspergillus* spp, observación del doble halo en la tira de caspofungina.

a las 24 h con Etest y a las 48 h con el M38-A [2,18,22]. Sin embargo la correlación a las 48 h fue del 73,3% para anfotericina B y del 42,6% para itraconazol. Para *A. flavus*, *P. boydii* y *S. prolificans* los valores de CMI por Etest son más bajos que los obtenidos por el método M38-A [2]. A pesar de los buenos resultados preliminares de este método todavía se requieren más estudios para poder ser introducido en los laboratorios de microbiología clínica, y para determinar su correlación de los datos *in vivo*.

Unos consejos...

A la vista de los resultados publicados con los métodos alternativos al NCCLS, el método más útil para la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica sería:

En levaduras:

- Para la mayoría de los antifúngicos: el método colorimétrico Sensititre YeastOne.
- Para la anfotericina B: el método Etest, utilizando el medio RPMI con 2% de glucosa ó el medio MHA con azul de metileno + glucosa.

En los **hongos filamentosos** hace falta realizar más estudios, sobre todo de correlación *in vitro-in vivo*, pero parece que por los datos publicados hasta la fecha tanto el método colorimétrico Sensititre YeastOne como el E test podrían ser una buena alternativa, e incluso el método de difusión, éste último especialmente para las equinocandinas.

Referencias

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard NCCLS document M27 A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2002.
- Espinel-Ingroff A, Warnock DW, Vazquez JA, Arthington-Skaags BA. In vitro antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med Mycol* 2000; 38 (Supl.1): 293-304.
- Martín Mazuelos E. Métodos de estudio de sensibilidad in vitro de levaduras. *Rev Esp Quimioter* 2000; 13: 99-103.
- Bernal S, Aller AI, Chavez M, Valverde A, Serrano MC, Gutiérrez MJ, Quindós G, Martín-Mazuelos E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric microdilution method for antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. *Chemotherapy* 2001; 48: 21-25.
- Espinel - Ingroff A, Pfaller MA, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 718-721.
- Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Álvarez E, Baquero F, Cisterna R, Gil J, Martín-Mazuelos E, Rubio C, Sánchez-Sousa A, Serrano C. Sensititre yeast one® caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: correlation with NCCLS M27-A2. Multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1604-1607.
- López -Jodra O, Torres- Rodríguez JM, Méndez-Vasquez E, Rivas- Focardell Y, Baró-Tomás T, Alía- Ponte C. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 645-649.
- Willinger B, Engelman E, Hofmann H, Metzger S, Apfalter P, Hirschl AM, Makristani A, Rotter M, Raddatz B, Seibold M. Multicenter comparison of Fungitest for susceptibility testing of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 253-257.
- Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 336-342.
- Martín Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Aller AI, Bernal S, Martínez MA, Montero O, Quindós G. A comparative evaluation of E-test and microdilution broth method for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2000; 43:477-481.
- Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick L, Rodríguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between Etest, Disk diffusion and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1647-1651.
- Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of Etest method using Mueller Hinton agar with glucosa and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4977-4979.
- Aller AI, Martín Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Bernal S, Chávez M, Recio FJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 997-1000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline. NCCLS M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 2004.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa.
- Serrano MC, Valverde A, Chavez M, Bernal S, Claro R, Peman J, Ramirez M, Martín-Mazuelos E. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER 002, LY 303366) against *Aspergillus* spp. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 131-135.
- Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: Review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-136.
- Martín-Mazuelos E, Peman J, Valverde A, Chavez M, Serrano MC, Cantón E. Comparison of Sensititre YeastOne Colorimetric antifungal panel with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 365-370.
- Castro C, Serrano MC, Flores B, Espinel-Ingroff A, Martín-Mazuelos E. Comparison of Sensititre YeastOne Colorimetric antifungal panel with a modified NCCLS M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4358-4360.
- Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3084-3087.
- Arikan S, Yurdakul P, Hascelik J. Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of micafungin against *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 47: 2640-2643.
- Serrano MC, Ramirez M, Morilla, D, Valverde A, Chavez M, Espinel-Ingroff A, Claro R, Fernandez A, Almeida C, Martín-Mazuelos E. A comparative study of the disk diffusion method with the broth microdilution and E-test methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 739-742.

