

Emilia Cantón Lacasa  
Estrella Martín Mazuelos  
Ana Espinel-Ingroff

## 15a.1. Fundamento

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas, la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaba muy justificada. A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias.

Motivado por esta nueva realidad, el "Clinical Laboratory Standard Institute" (CLSI, antes NCCLS) realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Además, se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a una serie de cepas utilizando su propia metodología. Los resultados mostraron que pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad antifúngica y que la metodología empleada (medio de cultivo, inóculo, etc.) era muy variada. Los resultados de las CMI también fueron impactantes: en algunos casos, las diferencias entre los distintos laboratorios fueron hasta 512 veces mayores.

Como consecuencia de esta realidad el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* y en *Cryptococcus neoformans*, que dió lugar a la publicación, en 1992, de la propuesta de un método (M27-P). En 1995 se publicó el método provisional (M27-T) y, en 1997, se aprobó definitivamente el método conocido como M27-A en el que se incorporan los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina y las CMI para las cepas control de calidad. En el año 2008 se publicó un nuevo documento, el M27-A3, en el que se incluyen los valores de la CMI de voriconazol, ravuconazol y posaconazol para las cepas control de calidad. En un intento de facilitar y agilizar la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en los laboratorios clínicos, en 2003 el comité estandarizó el método de difusión en disco, (documento M44-P) que fue aprobado definitivamente en 2004 (documento M44-A).

Como complemento del método de sensibilidad para levaduras, en 1998 el CLSI publicó su propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad

antifúngica en hongos filamentosos (documento M38-P) y en 2002 aprobó el método definitivo (documento M38-A).

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina sólo estaban determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con sida y para las candidemias. Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeo (EUCAST) como americano (CLSI). Recientemente, una revisión exhaustiva de los puntos de corte de fluconazol, realizada por Pfaller y cols. [1], en la que se incluyen 603 candidiasis invasoras y 692 candidiasis orofaríngeas producidas por aislados con CMI a fluconazol elevadas, ha permitido ratificar los puntos de corte de fluconazol propuestos por el CLSI tanto los determinados por el método de microdilución como los determinados por difusión en disco.

En este Capítulo se describen con detalle los métodos de referencia para levaduras, M27-A3 y M44-A [2,3], y para hongos filamentosos, M38-A, propuestos por el CLSI [4]. Básicamente, consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura o moho en el mismo medio pero sin antifúngico (control). El medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación de estos parámetros puede afectar los resultados.

## 15a.2. Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

### 15a.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado

## Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH 7±0,1 y con 0,2% de glucosa.

### Componentes:

- RPMI 1640 ..... 10,40 g
- Tampón MOPS ..... 34,53 g
- Agua destilada ..... 1.000 ml

### Preparación:

1. Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
2. Ajustar el pH a 6,9 - 7,1, utilizando NaOH 1N ó 10N (medir la cantidad utilizada).
3. Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.
4. Filtrar estérilmente.
5. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

### 15a.2.2. Preparación de la solución madre de antifúngico

Preferiblemente debe utilizarse sustancia valorada que se puede solicitar a los laboratorios productores.

#### Un consejo...

- En caso de no disponer de sustancia valorada se puede utilizar el preparado comercial para infusión endovenosa, comprobando que las CMI para las cepas control estén dentro del intervalo recomendado.

### Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 10 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y disolverla en agua destilada estéril.
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

#### Un consejo...

- El tiempo de estabilidad indicado es orientativo ya que depende del tipo de antifúngico. Una vez descongelado no debe volverse a congelar. Las placas de antifúngico preparadas tendrán la misma fecha de caducidad que la de la solución madre.

### Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1.600 µg/ml (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolverla en dimetil sulfóxido (DMSO).
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

#### Unos consejos...

- Es importante seguir estas recomendaciones ya que concentraciones de antifúngico más elevadas no se disuelven bien.
- Normalmente la solución madre no necesita esterilizarse pero si, para mayor seguridad, se quiere esterilizar, debe hacerse por filtración (mediante filtros de membrana o cualquier otro material que no absorba o retenga el antifúngico).

### 15a.2.3. Preparación de las diluciones de antifúngico

Se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

### Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina)

Seguir las indicaciones de la [Tabla 15a.1](#) y las [Figuras 15a.1](#) y [15a.2](#). Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 64 y 0,12 µg/ml. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

#### Brevemente:

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640.
2. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml).

Tabla 15a.1. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
n° 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	n° 2
n° 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	n° 3
n° 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	n° 4
n° 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	n° 5
n° 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	n° 6
n° 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	n° 7
n° 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	n° 8
n° 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	n° 9
n° 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	n° 10
n° 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	n° 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo n° 11 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.
- En los tubos n° 2 al n° 11 la concentración del antifúngico es 10 veces superior a la concentración final deseada.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

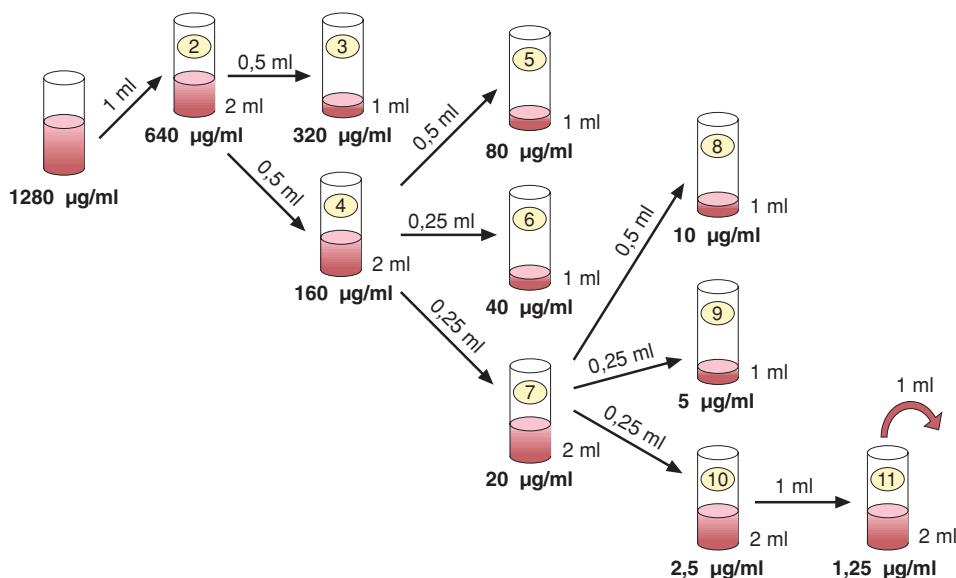


Figura 15a.1. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

## Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

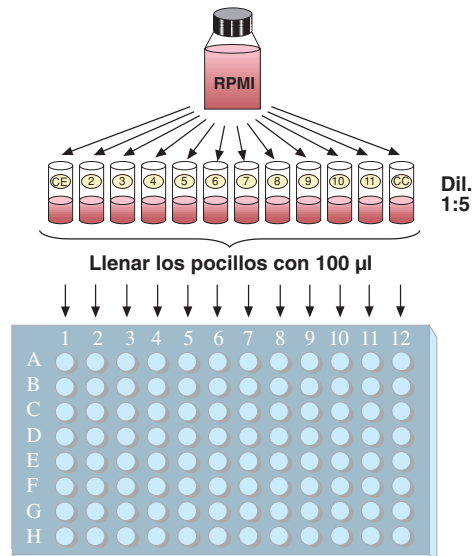
### Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

Los pasos a seguir se detallan en la [Tabla 15a.2](#) y en las [Figuras 15a.3](#) y [15a.4](#). Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 16 y 0,03  $\mu\text{g/ml}$ . Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Brevemente:

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.
2. Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100  $\mu\text{l}$  de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32  $\mu\text{g/ml}$  - 0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) y la de DMSO, 2% ([Figura 15a.4](#)).

Añadir a todos los tubos 4 ml de RPMI



Concentración final después de inocular: 64 - 0,12  $\mu\text{g/ml}$

**Figura 15a.2.** Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de microdilución).

**Tabla 15a.2.** Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 $\mu\text{g/ml}$	nº 3
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 $\mu\text{g/ml}$	nº 4
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 $\mu\text{g/ml}$	nº 5
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 $\mu\text{g/ml}$	nº 6
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$	nº 7
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 $\mu\text{g/ml}$	nº 8
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 $\mu\text{g/ml}$	nº 9
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 $\mu\text{g/ml}$	nº 10
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 $\mu\text{g/ml}$	nº 11

#### Observar que...

- Al terminar las diluciones, todos los tubos contienen 1 ml excepto el nº11 que contiene 2 ml.
- En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antifúngico es 100 veces superior a la concentración final deseada.
- Los tubos nº 2 al nº 11 están diluidos en DMSO.

#### 15a.2.4. Llenado de las placas

Las placas de microtiter se rellenan con 100  $\mu\text{l}$  de solución de antifúngico siguiendo los siguientes pasos ([Figuras 15a.2](#) y [15a.4](#)):

- El contenido del tubo nº 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100  $\mu\text{l}$  y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A - 2H).

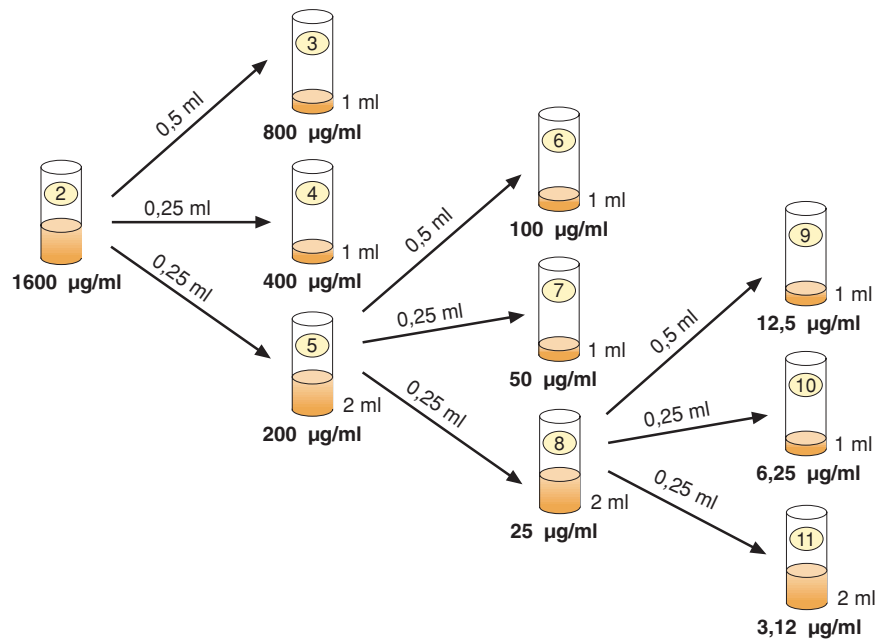
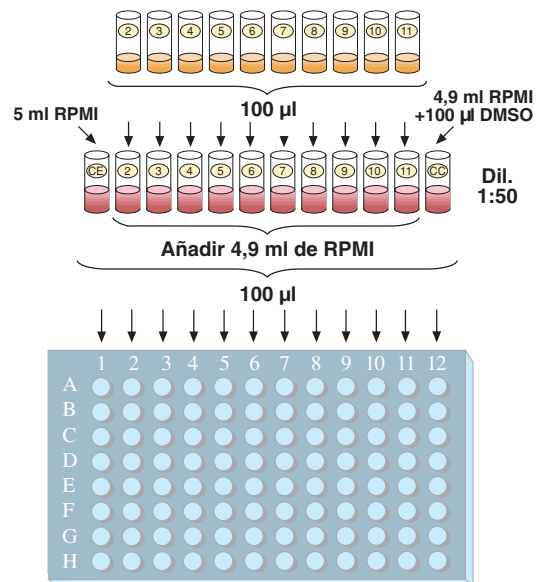


Figura 15a.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).

- Con el contenido del tubo n° 3 se llenan los pocillos de la columna n° 3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo n° 4 se llenan los pocillos de la columna n° 4 (4A - 4H).
- Etc.... y así hasta la columna n° 11.
- Los pocillos de la columna n° 12 se llenan con 100 µl de RPMI (control de crecimiento). **ATENCIÓN:** cuando se trata de antifúngicos insolubles en agua, la columna n° 12 se rellena con 100 µl de RPMI con un 2% de DMSO, o el disolvente que se haya utilizado.
- Los pocillos de la columna n° 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad).
- Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o bien a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**¡Atención!**

- La fecha de caducidad de las placas será la de la solución madre y no la del día de preparación de las placas.



Concentración final después de inocular: 16-0,03 µg/ml

Figura 15a.4. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

### 15a.2.5. Preparación del inóculo

Si la levadura ha estado almacenada o congelada, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA).

#### Inóculo para *Candida* spp.

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (ClNa 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ ). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de  $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ . En la [Figura 15a.5](#) se representan esquemáticamente todos estos pasos.

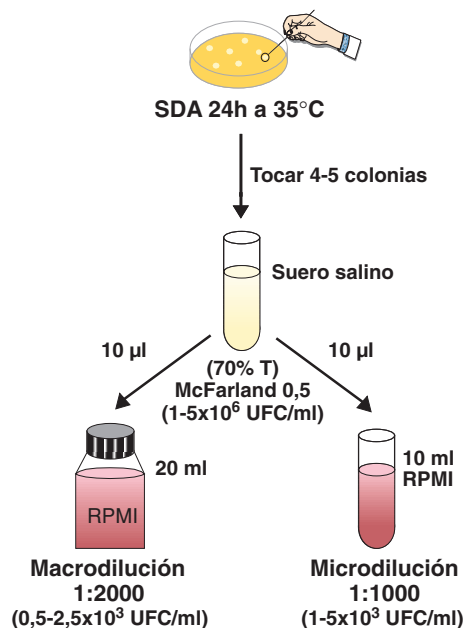


Figura 15a.5. Preparación del inóculo de levaduras.

#### Inóculo para *C. neoformans*

Se prepara igual que para *Candida* spp., pero partiendo, en este caso, de un cultivo de 48 h en SDA.

### 15a.2.6. Inoculación de las placas

El día del ensayo se sacan las placas del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

Se inoculan con 100 µl de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.

La columna nº 1 (1A - 1H) que contiene 200 µl de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio.

La columna nº 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento.

### 15a.2.7. Control de pureza del cultivo

Es conveniente hacer un control del inóculo utilizado; para ello se siembran 10 µl del pocillo control (nº 12) en una placa de CHROMagar y, a las 24 h, se cuentan las UFC. De esta forma se controla la pureza y densidad del cultivo y se comprueba la identificación de la cepa.

### 15a.2.8. Incubación de las placas

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h.

#### Observar que...

- Al inocular las placas, las concentraciones de los pocillos se diluyen 1/2. En consecuencia, la concentración final de antifúngico en los pocillos será de 64 µg/ml a 0,12 µg/ml, en los solubles en agua, y de 16 µg/ml a 0,03 µg/ml en los insolubles.
- En una placa de antifúngico se pueden ensayar hasta 8 cepas diferentes.

### 15a.2.9. Lectura e interpretación de los resultados

#### Lectura visual

La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido.

**Azoles y 5-fluorocitosina:** la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ( $\geq 50\%$ ), comparada con el crecimiento control después de 48 h de incubación.

**Equinocandinas:** La CMI se lee como en los azoles pero a las 24 h de incubación.

**Anfotericina B:** la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

#### Unos consejos...

- En general, para los **antifúngicos fungiestáticos**, la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ( $\geq 50\%$ ), comparada con el crecimiento control.
- **ATENCIÓN:** La CMI de las equinocandinas se lee a las 24 h de incubación.
- Para los **antifúngicos fungicidas**, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

#### Lectura espectrofotométrica

Aunque no es la recomendada por el CLSI, puede hacerse una lectura espectrofotométrica a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530 nm ya que, prácticamente, la CMI no varía [5,6].

Antes de realizar la lectura espectrofotométrica es conveniente agitar las placas para obtener una suspensión homogénea y, una vez realizada, se resta a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir la absorbancia del pocillo de la columna nº 1.

La CMI para los azoles, 5-fluorocitosina, equinocandinas y, en general, los **antifúngicos fungistáticos**, es la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica es  $\leq 50\%$  del pocillo control de crecimiento (pocillo de la columna nº 12). La CMI para la anfotericina B y, en general, otros **antifúngicos fungicidas**, es la concentración más baja cuya densidad óptica es  $\leq 5\%$  del control.

#### Observaciones...

- La lectura de las CMI en los azoles suele ser una de las fuentes de variabilidad tanto intra como interlaboratorio. Es un poco complicada para los no entrenados ya que se mantiene un cierto crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI. A este crecimiento se le llama "cola de crecimiento" (*trailing growth*) y se presenta sobre todo en las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.
- Algunas veces, cuando se realiza la lectura visual, es conveniente agitar los pocillos con un bastoncillo de madera estéril, para poder comparar la turbidez con la del pocillo control.

### 15a.2.10. Cepas control de calidad

En cada ensayo debe incluirse una cepa control para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

*C. parapsilosis* ATCC 22019  
*C. krusei* ATCC 6258

Son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente. En la [Tabla 15a.3](#) se especifica las CMI de los antifúngicos para estas cepas [2,7-9].

### 15a.2.11. Puntos de corte para *Candida* spp.

Por el momento, sólo se dispone de los puntos de corte para fluconazol, itraconazol, voriconazol, equinocandinas y 5-fluorocitosina. Para establecer los puntos de corte para fluconazol, el CLSI se ha basado en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas en pacientes con sida y, en menor cantidad, en candidemias producidas por *Candida* en enfermos no neutropénicos. Recientemente estos puntos de corte se han confirmado incluyendo más casos tanto de candidiasis invasoras como orofaríngeas [1,10]. Por tanto, sólo son aplicables a las micosis orofaríngeas y candidemias de especies del género *Candida*, excepto *C. krusei*, que es intrínsecamente resistente a fluconazol. Para itraconazol, los datos se basan en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas y no se dispone hasta la fecha de datos en micosis invasoras. Los puntos de corte de 5-fluorocitosina están basados en antiguos datos farmacocinéticos *in vivo* para *Candida*. Los puntos de corte de voriconazol están basados en el análisis de los datos obtenidos de 249 pacientes de seis estudios clínicos en fase III de voriconazol [11].

## Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

**Tabla 15a.3. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A3 [2,7-9].**

Antifúngico	Intervalos de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Anfotericina B	0,25 - 2	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Anidulafungina	0,25 - 2	0,5 - 2	0,03 - 0,12	0,03 - 0,12
Caspofungina	0,25 - 1	0,5 - 4	0,12 - 1	0,25 - 1
Micafungina	0,25 - 2	0,5 - 4	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Fluconazol	0,5 - 4	1 - 4	8 - 64	16 - 128
Itraconazol	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Ketoconazol	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Posaconazol	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
Ravuconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,25 - 1
Voriconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
5-fluorocitosina	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5	4 - 16	8,0 - 32

Aplicando estos criterios, el CLSI ha establecido diferentes categorías de sensibilidad: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD) [2,9-11].

- La categoría de **sensible** no lleva implícito el éxito terapéutico.
- La categoría de **resistente** se correlaciona con un ~60% de fracaso terapéutico.
- La categoría **S-DD** para el fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis  $\geq 400$  mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal. Para el itraconazol se basan en una buena absorción del fármaco y que se alcancen niveles en sangre  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ .

En la categoría de intermedio, sólo aplicable a 5-fluorocitosina, no se sabe con certeza si la cepa es sensible, ya que los datos que se tienen no permiten categorizarla como sensible o resistente.

En la [Tabla 15a.4](#) se indican los puntos de corte de los antifúngicos.

**Tabla 15a.4. Puntos de corte según el CLSI [2,9-11].**

Antifúngico	Intervalos de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
Fluconazol	$\leq 8$	16 - 32	–	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,12$	0,25 - 0,5	–	$\geq 1$
Voriconazol	$\leq 1$	2	–	$\geq 4$
5-fluorocitosina	$\leq 4$	–	8 - 16	32
Caspofungina*	$\leq 2$	–	–	$> 2$
Micafungina*	$\leq 2$	–	–	$> 2$
Anidulafungina*	$\leq 2$	–	–	$> 2$

\*No sensible.

### 15a.3. Método de macrodilución para levaduras (M27-A3)

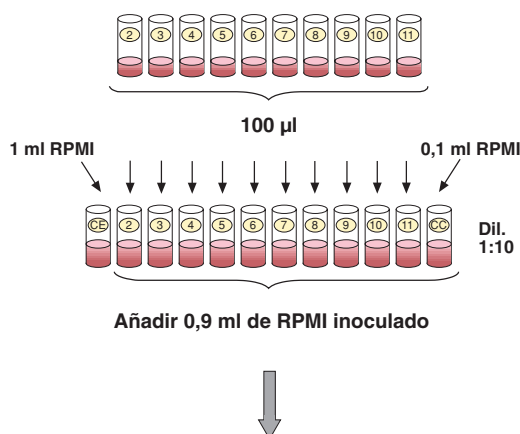
En este método se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del mismo y de la solución madre de antifúngico es igual al método de microdilución.

#### 15a.3.1. Preparación de las diluciones de antifúngico

##### Antifúngicos solubles en agua

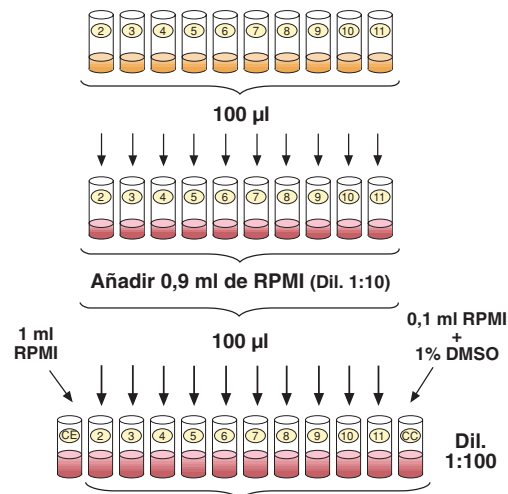
1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la [Figura 15a.1](#).
2. Las diluciones se reparten en alícuotas de 0,1 ml, en tubos de 11x70 y se congelan a  $-70$  °C hasta su utilización completamente cerrados.
3. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado ([Figura 15a.6](#)).





Concentración final después de inocular:  
64 - 0,12 µg/ml

Figura 15a.6. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de macrodilución).



Concentración final en los tubos:  
16 - 0,03 µg/ml

Figura 15a.7. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de macrodilución).

### Antifúngicos insolubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la Figura 15a.3.
2. Diluir 1/10 en RPMI.
3. Se reparten en alícuotas de 0,1 ml en tubos de 11x70 y se congelan a -70 °C, completamente cerrados, hasta su utilización.
4. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado (Figura 15a.7).

### 15a.3.2. Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de McFarland se diluye 1/2000 en medio RPMI (concentración  $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/ml) (Figura 15a.5).

### 15a.3.3. Temperatura y tiempo de incubación

Igual que para el método de microdilución.

### 15a.3.4. Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido 1/20 (0,2 ml del tubo control más 0,8 ml de RPMI). La CMI de los azoles y 5-fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento del 80%. La CMI de la anfotericina B es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento del 100%. En la Tabla 15a.5 se resume las CMI de las cepas control de calidad para este método [12,13].

En la Tabla 15a.6 se resume el método M27-A3.

Tabla 15a.5. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de macrodilución M27-A3 [12,13].

Antifúngico	Intervalos de las CMI (µg/ml)	
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Anfotericina B	0,25 - 1	0,25 - 2
Fluconazol	2 - 8	16 - 64
Itraconazol	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5
Ketoconazol	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5
5-fluorocitosina	0,12 - 0,5	4 - 16

### Utilidad de la macrodilución

- El método de macrodilución se utiliza muy poco, pero a veces puede ser útil cuando se requiere un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales o placas preparadas.
- También es útil en aquellas cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (*trailing growth*).

Tabla 15a.6. Resumen del método M27-A3.

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato sódico y con un indicador de pH
pH	6,9 - 7,1
Tampón	Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) a una concentración 0,164 moles/litro
Inóculo	Entre 0,5x10 <sup>3</sup> y 2,5x10 <sup>3</sup> UFC/ml
Incubación	<i>Candida</i> spp., 48 h a 35 °C con todos los antifúngicos, excepto las equinocandinas que se incuban durante 24 h <i>C. neoformans</i> , 72 h a 35 °C
Concentraciones a ensayar	Fluconazol y 5-fluorocitosina: 64-0,06 µg/ml Anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, caspofungina: 16-0,03 µg/ml
Definición de la CMI	Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de 100% Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento ≥ 50% (por microdilución) a las 48 h de incubación Equinocandinas: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento ≥50% a las 24 h de incubación
Puntos de corte	Fluconazol: S ≤ 8 µg/ml; S-DD 16-32 µg/ml; R ≥ 64 µg/ml Itraconazol: S ≤ 0,12 µg/ml; S-DD 0,25-0,5 µg/ml; R ≥ 1 µg/ml Voriconazol: S ≤ 1 µg/ml, S-SD 2 µg/ml; R ≥ 4 µg/ml 5-fluorocitosina: S ≤ 4 µg/ml; I 8-16 µg/ml; R ≥ 32 µg/ml Equinocandinas: S ≤ 2 µg/ml; NS > 2 µg/ml
Cepas control	<i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
NS: no sensible.	

### 15a.4. Método de difusión en disco M44-A

La utilidad de los métodos de sensibilidad basados en la difusión del antifúngico a partir de discos o tabletas ha estado limitada por los problemas de difusión en agar de los mismos y por su falta de correlación con la clínica. Se ha encontrado correlación con fluconazol y voriconazol entre los halos de inhibición de discos de 25 µg (fluconazol) y 1 µg (voriconazol: Becton Dickinson, Wheatridge, Colo.) y las CMI obtenidas por el método M27-A3. En 2003, el CLSI estandarizó el método de difusión-disco (documento M44-P) y en 2004 publicó el documento definitivo (documento M44-A) [3] para *Candida* spp. con fluconazol y voriconazol.

#### 15a.4.1. Fundamento

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias pero con algunas modificaciones.

#### 15a.4.2. Medio de cultivo

Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporar los suplementos cuando se prepara el medio o bien incorporar los suplementos a las placas de MHA ya preparadas.

La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos *in vivo*. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h.

**Solución madre de glucosa (40%)**

- Glucosa ..... 40 g
- Agua destilada ..... 100 ml

Calentar suavemente hasta completa disolución de la glucosa.

**Solución azul metileno (5 mg/ml)**

- Azul metileno ..... 0,1 g
- Agua destilada ..... 20 ml

**Solución madre de glucosa-azul de metileno (GAM)**

1. Añadir 200 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa para obtener una solución GAM con una concentración final de glucosa de 0,4 mg/ml y 10 µg/ml de azul de metileno.
2. Dispensar en viales en alícuotas de 3,5 o 1,5 ml.
3. Esterilizar en autoclave 25 min a 121 °C.
4. Guardar a temperatura ambiente (máximo 1 año)

**Preparación de placas MHA suplementado con glucosa y azul de metileno**

1. Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
2. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 15 cm (altura de la capa de agar 4 mm).
5. Dejar enfriar y guardar en nevera.

Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas (Figura 15a.8).

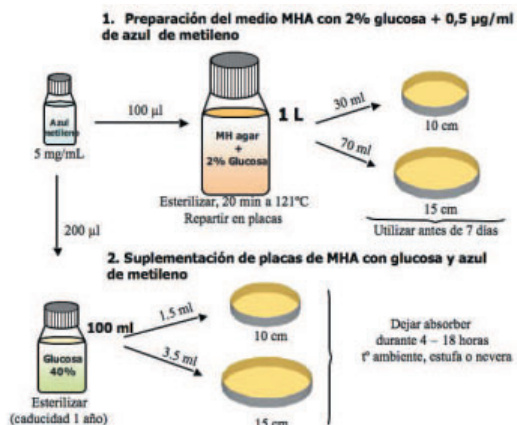


Figura 15a.8. Preparación del medio de Mueller-Hinton agar suplementado (1) y suplementación de las placas de MHA (2).

**Suplementación de las placas de MHA con glucosa y azul de metileno**

1. Verter 1,5 ml de la solución de GAM sobre la superficie de la placa de MHA de 9-10 cm o 3,5 ml si es de 15 cm.
2. Repartir el líquido uniformemente por toda la superficie de la placa con ayuda de un asa de cristal o bolas de cristal.
3. Dejar a temperatura ambiente o en el refrigerador el tiempo necesario para que se absorba todo el líquido antes de proceder a la inoculación de la placa. El tiempo depende de la humedad de la placa, en general de 4 - 18 h.

**Un consejo...**

- Es mejor preparar las placas el día anterior al ensayo y dejarlas durante toda la noche en nevera con el fin de que haya una absorción completa.

**15a.4.3. Preparación del inóculo**

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias  $\geq 1$  mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina estéril (CINa 0,85%) como se ha descrito para el método M27-A3. Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/ml (Figura 15a.9).

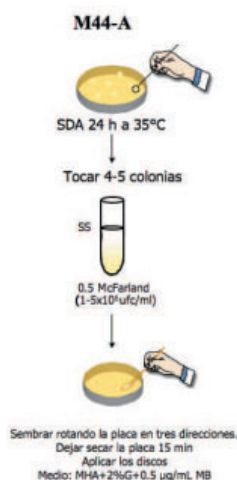


Figura 15a.9. Preparación inóculo levaduras (M44-A).

### 15a.4.4. Inoculación de las placas

1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
3. Sembrar la placa uniformemente.
4. Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
5. Aplicar los discos.

### 15a.4.5. Temperatura y tiempo de incubación

Incubar a 35 °C durante 20-24 h para *Candida* spp. y 48 h para *Cryptococcus* spp.

### 15a.4.6. Lectura

Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h.

Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento.

La lectura es subjetiva y se requiere experiencia para dar medidas exactas.

La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo deben ser ignoradas.

*C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación.

### 15a.4.7. Cepas Control de Calidad

En cada ensayo debe incluirse al menos una cepa control de calidad para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

- *C. parapsilosis* ATCC 22019
- *C. krusei* ATCC 6258
- *C. albicans* ATCC 90028
- *C. tropicalis* ATCC 750

En la Tabla 15a.7 se especifican los diámetros de los halos de inhibición para las cepas control de calidad.

### 15a.4.8. Puntos de corte para *Candida* spp.

En la Tabla 15a.8 se especifican los diámetros equivalentes a los puntos de corte.

Tabla 15a.7. Diámetro de las cepas control de calidad [3,14-16].

Antifúngico	Carga del disco	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
Fluconazol	25 µg		22 - 33	28 - 39	26 - 37
Voriconazol	1 µg	16 - 25	28 - 37	31 - 42	*
Posaconazol	5 µg	23 - 31	25 - 36	24 - 34	23 - 33

\*No se han establecido en esta cepa debido a la variabilidad encontrada.

Tabla 15a.8. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida* spp. [1,3,11,15,23].

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)			CMI (µg/ml)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 µg	≤14	15 - 18	≥19	≥64	16 - 32	≤8
Voriconazol	1 µg	≤13	14 - 16	≥17	≥4	2	≤1
Caspofungina	5 µg	≤10*	–	≥11	>2*	–	≤2

S, sensible. S-DD, sensible dependiendo de la dosis. R, resistente. \*No sensible.

Tabla 15a.9. Resumen documento M44-A.

Medio de cultivo	Mueller Hinton agar + 2% glucosa + 0,5 mg/ml azul de metileno
pH	7,2 – 7,4
Inóculo	0,5 McFarland (1-5 x 10 <sup>6</sup> UFC/ml)
Tiempo y temperatura de incubación	35 °C durante 20 a 24 h Algunos aislados de <i>C. glabrata</i> y <i>C.krusei</i> a menudo necesitan 48 h.
Carga del disco	Fluconazol 25 µg Voriconazol 1 µg Posaconazol 5 µg
Medida del halo de inhibición	Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento
Puntos de corte	Fluconazol: R ≤14 mm, S-DD 15 – 18 mm, S ≥19 mm. Voriconazol: R ≤13 mm, S-DD 14 – 16 mm, S ≥17 mm
Diámetro de inhibición de las cepas control de calidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 fluconazol: 22 - 23 mm voriconazol: 28 - 37 mm posaconazol: 25 - 36 mm caspofungina: 14 - 23 mm</li> <li>• <i>C. krusei</i> ATCC 6258 voriconazol:16 - 25 mm posaconazol: 23 - 31 mm caspofungina: 18 - 26 mm</li> <li>• <i>C. albicans</i> ATCC 90028 fluconazol: 28 - 39 mm voriconazol: 31 - 42 mm posaconazol: 24 - 34 mm caspofungina: 18 - 27 mm</li> <li>• <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 fluconazol: 26 - 37 mm posaconazol: 23 - 33 mm caspofungina: 20 - 27 mm</li> </ul>

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

### 15a.5. Método de microdilución en caldo M38-A para hongos filamentosos

En 1998 el CLSI publicó el documento M38-P y en 2002 el documento M38A [4] donde se describe el método para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a los hongos filamentosos formadores de conidias. Hasta el momento se ha

evaluado en especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, así como en *Pseudallescheria boydii* y en las formas micelares de *Sporothrix schenckii*. No se ha utilizado en formas levaduriformes de los hongos dimórficos tales como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum*.

Las características del medio de cultivo, pH, preparación de la solución madre de antifúngico y diluciones son iguales a las del método M27-A3 (Figuras 15a.1 – 15a.4).

### 15a.5.1. Preparación del inóculo

En el género *Aspergillus* y en las especies *P. boydii*, *R. arrhizus* y *S. schenckii* el inóculo se prepara a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar glucosado de patata (PDA), medio que induce la formación de conidias o esporangiosporas.

Para las especies del género *Fusarium* se parte de un cultivo de 48 a 72 h a 35 °C y posteriormente a 25-28 °C hasta completar siete días, en PDA (Figura 15a.10).

1. Para facilitar la recogida de conidias, introducir el asa de cultivo en Tween 20 y pasarla por encima de las conidias; después resuspender en solución salina.
2. Dejar sedimentar las partículas durante 3-5 min, transferir el sobrenadante a otro tubo y agitar vigorosamente durante 15 segundos.
3. Debido a que el tamaño de las conidias es distinto para cada especie, la densidad óptica (DO) para obtener una concentración de  $1-5 \times 10^6$  variará con la especie. Para *Aspergillus* spp. y *S. schenckii* se ajusta a una DO de 0,09-0,17 (80-82% transmitancia): 0,41-0,56 McFarland. Para *Fusarium*, *P. boydii* y *R. arrhizus* a 0,15-0,17 (68-70% de transmitancia): 0,68-0,77 McFarland. No obstante, es aconsejable confirmar las UFC/ml de estas DO en cada espectrofotómetro particular.
4. Diluir 1/50 en RPMI 1640. Es posible que *P. boydii* requiera una dilución menor.

En cada ensayo debe controlarse el inóculo, para ello se siembran 100 µl de una dilución 1/100 del inóculo en SDA y se incuba a 28-30 °C hasta que se observa la presencia de colonias (24-26 h para *Rhizopus* spp., 40-50 h para la mayoría de los hongos y >5 días para *P. boydii*). En la Tabla 15a.10 se especifican las UFC obtenidas para diferentes hongos filamentosos [17-19].

### 15a.5.2. Inoculación de las placas

Cada pocillo se inocula con 100 µl de la suspensión de conidias o esporangiosporas. En este paso, tanto la concentración de antifúngico como el inóculo se diluyen. El pocillo control de crecimiento debe tener la misma concentración final (1%) del diluyente del antifúngico.

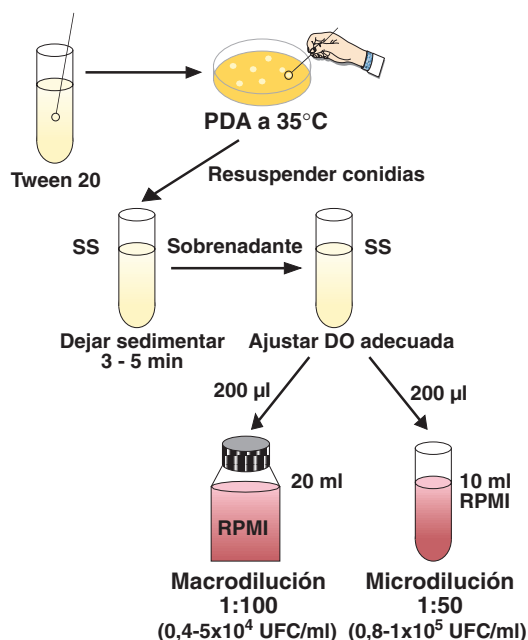


Figura 15a.10. Preparación del inóculo para hongos filamentosos.

Tabla 15a.10. Intervalos de DO y de UFC/ml para los hongos filamentosos [17-19].

	Intervalo de DO	Intervalo de UFC/ml
<i>Aspergillus flavus</i>	0,09 - 0,11	0,4 - $4,0 \times 10^6$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,09 - 0,11	0,6 - $5,0 \times 10^6$
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,09 - 0,11	1,1 - $2 \times 10^6$
<i>Aspergillus niger</i>	0,1 - 0,42	1,0 - $2,8 \times 10^6$
<i>Aspergillus terreus</i>	0,09 - 0,11	0,9 - $5 \times 10^6$
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	0,2 - 0,3	0,07 - $0,4 \times 10^6$
<i>Bipolaris spicifera</i>	0,2 - 0,3	0,3 - $3 \times 10^6$
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $3,1 \times 10^6$
<i>Dactylaria constricta</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $1 \times 10^6$
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,15 - 0,17	0,8 - $5,0 \times 10^6$
<i>Fusarium solani</i>	0,15 - 0,17	0,5 - $5,9 \times 10^6$
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,09 - 0,13	0,8 - $2,3 \times 10^6$
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,05 - 0,15	1,1 - $3,5 \times 10^6$
<i>Pseudallescheria boydii</i>	0,15 - 0,17	1,0 $\times 10^6$
<i>Penicillium</i> spp.	0,08 - 0,31	1,9 - $2,7 \times 10^6$
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $3,2 \times 10^6$
<i>Scedosporium prolificans</i>	0,15 - 0,17	0,6 - $1,7 \times 10^6$
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0,18 - 1,2	0,2 - $4,5 \times 10^6$
<i>Sporotrix schenkei</i>	0,09 - 0,11	2,4 $\times 10^6$
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,09 - 0,11	0,7 - $2,3 \times 10^6$
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $2,6 \times 10^6$
<i>Wangiella dermatitidis</i>	0,15 - 0,17	1,2 - $3,7 \times 10^6$

### 15a.5.3. Incubación

Las placas se incuban a 35 °C sin agitación hasta que se observa crecimiento en el pocillo control. Dependiendo de la especie el tiempo de incubación varía; así, para *Rhizopus* spp. el tiempo de incubación oscila entre 21-26 h. Sin embargo, las especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, así como *S. schenckii* se incuban durante 46-50 h y *P. boydii*, durante 70-74 h.

### 15a.5.4. Lectura de los resultados

La CMI de los azoles, 5-fluorocitosina y anfotericina B es la concentración más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100%). Para las equinocandinas se determina la concentración mínima que produce cambios morfológicos (Figura 15a.11) o concentración mínima efectiva (CME) a las 24 h (*Aspergillus* spp. y otros hongos oportunistas) y a las 48 h (*Scedosporium* spp.) [20].

### 15a.5.5. Interpretación de los resultados

Para los hongos filamentosos el CLSI, hasta la fecha, no ha indicado puntos de corte.

**Anfotericina B.** Por los datos que se tienen, las CMI de anfotericina B suelen estar comprendidas entre 0,5 y 2 µg/ml, aunque para algunas especies como *A. terreus*, *Acremonium strictum*, *S. apiospermum* y *S. prolificans* la CMI de anfotericina B puede estar comprendida entre 2 y >16 µg/ml.

**5-fluorocitosina.** En general, los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico; la mayoría de las CMI son >64 µg/ml, con la excepción de algunas cepas de *Aspergillus* spp. y hongos dematiáceos.

**Fluconazol.** Los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico, la mayoría de las CMI son >64 µg/ml, con la excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos.

**Ketoconazol.** Las CMI suelen estar comprendidas entre 0,03 y 16 µg/ml.

**Itraconazol.** Las CMI de este antifúngico suelen estar comprendidas entre 0,03 y 16 µg/ml. La mayor fuente de error en la determinación de la CMI a itraconazol suele proceder del disolvente utilizado y concentración final del mismo. El CLSI recomienda no variar el esquema de diluciones pro-

puesto (utilizar DMSO, concentración de la solución madre 1600 µg/ml y concentración final de DMSO en los pocillos de la placa de microtiter 1%).

### 15a.5.6. Cepas de control de calidad y de referencia

Recientemente se ha propuesto como cepa control de calidad *Paecilomyces variotii* MYA-3630 [21]; como cepas de referencia tenemos *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305. Se pueden usar como cepas de control de calidad del medio y concentración de antifúngico las mismas que en el método M27-A3 (*C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019). En la Tabla 15a.11 se representan los intervalos de CMI para estas cepas.

Tabla 15a.11. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas de referencia y control de calidad (valores obtenidos a las 48 h de incubación y 100% inhibición del crecimiento) [4,17,21,22].

Antifúngico	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 204305	<i>P. variotii</i> MYA-3630
Anfotericina B	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Itraconazol	0,25 - 0,5	0,12 - 1	0,06 - 0,5
Posaconazol	0,06 - 0,5		0,03 - 0,25
Ravuconazol	0,5 - 4		
Voriconazol	0,5 - 4		0,015 - 0,12

## 15a.6. Método de macrodilución en caldo M38-A

Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm. Volumen final: 1 ml. El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico igual al método de microdilución (Tabla 15a.12).

### 15a.6.1. Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución (Figura 15a.10). A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de

## Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

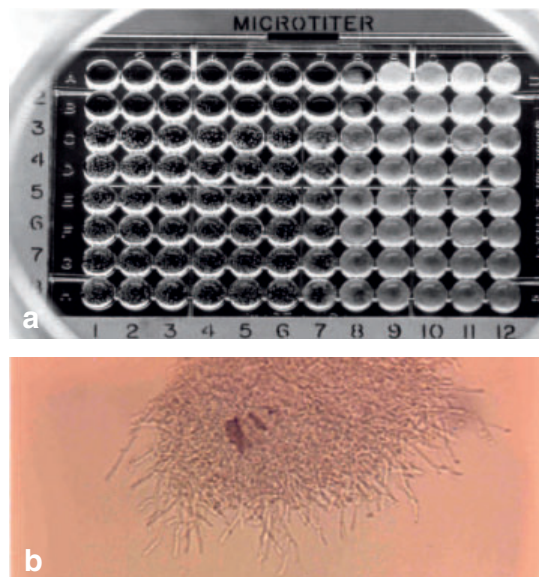
MacFarland se diluye 1/100 en medio RPMI (concentración  $0,4-5 \times 10^4$  UFC/ml) y se inoculan los tubos que contienen las concentraciones de antifúngico con 0,9 ml del inóculo diluido lo cual diluye estas concentraciones 1/10.

### 15a.6.2. Temperatura y tiempo de incubación

Igual que para el método de microdilución.

### 15a.6.3. Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. La CMI de los azoles, anfotericina B y 5-fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100%). La CME de las equinocandinas es la concentración más baja en la que se observan colonias muy pequeñas y muy ramificadas (ver figura 15a.11). Debe leerse a las 24 h en *Aspergillus* spp. y a las 48 h en *Scedosporium* spp.



**Figura 15a.11.** a: Aspecto macroscópico de la CME de caspofungina para *Aspergillus* spp. (CME columnas 7 y 6); b: Aspecto microscópico. Obsérvense hifas cortas y muy ramificadas de *A. fumigatus* (fotos tomadas de la Ref. 20).

**Tabla 15a 12. Resumen del método M38-A.**

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato sódico y con un indicador de pH
pH	6,9 - 7,1
Tampón	Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) a una concentración 0,164 moles/litro
Inóculo	Entre $0,4 \times 10^4$ y $5 \times 10^4$ UFC/ml
Incubación	<i>Rhizopus</i> spp., de 21 - 26 h a 35 °C <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp y <i>S. schenckii</i> de 46 - 50 h a 35 °C <i>P. boydii</i> de 70 - 74 h a 35 °C Las equinocandinas se leen el primer día (Ej. <i>Aspergillus</i> de 21 a 26 h)
Concentraciones a ensayar	Anfotericina B, azoles y equinocandinas: 16-0,03 $\mu$ g/ml
Definición de la CMI	Anfotericina B y azoles: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de 100%. Equinocandinas: La CME es la concentración más baja que produce un cambio morfológico del crecimiento, de filamentos a microcolonias (ver Figura 15a.11)
Puntos de corte	No están determinados
Cepas de referencia	<i>A. flavus</i> ATCC 204304 y <i>A. fumigatus</i> ATCC 204305
Cepas control de calidad	<i>P. variotii</i> MYA-3630



## ¿Cuándo deben realizarse las pruebas de sensibilidad?

1. En las micosis invasoras, en las que conviene conocer si la cepa es resistente al antifúngico puesto que se correlaciona con fracaso terapéutico. Lo contrario no siempre se cumple.
2. En las micosis orofaríngeas que no responden al tratamiento.
3. Cuando se quiere conocer la prevalencia de cepas resistentes en la institución.
4. En las micosis producidas por patógenos emergentes.

## Referencias

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

1. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 435-447.
- 2a. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2008).
- 2b. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third informational supplement. CLSI Document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2008).
- 3a. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast. Approved standard M44-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa.
- 3b. Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk susceptibility testing of yeasts; Informational supplement. CLSI document M44-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2007).
4. 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.
5. Pfaller MA, Messer SA, Coffman S, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoints determinations using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazole DO870. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1094-1097.
6. Lozano-Chiu M, Arkan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Rex JH. Optimizing Voriconazole susceptibility testing of *Candida*: effects of incubation time, endpoint rule, species of *Candida*, and level of fluconazole susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2755-2759.
7. Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Rennie RP, Rex JH, Rinaldi MG. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3457-3459.
8. Krisher K, Brown SD, Traczewski MM. Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 490.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Quality control minimal inhibitory concentration (MIC) limits for broth microdilution and MIC interpretive breakpoints. Supplement M27-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 771 E. Lancaster Avenue, Wayne, Pennsylvania 19085.
10. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-247.
11. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 819-826.
12. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards- recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1104-1107.
13. Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmström A, Rinaldi G. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 816-817.
14. Pfaller MA, Barry A, Bille J, Brown S, Ellis D, Meis JF, Rennie R, Rinaldi M, Rogers T, Traczewski M. Quality control limits for voriconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1716-1718.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints. Supplement M44-S1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 771 E. Lancaster Avenue, Wayne, Pennsylvania 19085.
16. Brown S, Traczewski M. Quality control limits for posaconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 222-3.
17. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper C Jr, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 139-143.
18. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3776-3781.
19. Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Petrikou E, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 719-722.
20. Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). *J Clin Microbiol* 2003; 41: 403-409.
21. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller M, Rinaldi M, Schell W, Walsh T. Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M 38-A document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43: 5243-5246.
22. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1828-1835.
23. Brown SD, Traczewski MM. Caspofungin disk diffusion breakpoints and quality control. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1927-1929.



Manuel Cuenca-Estrella  
Juan Luis Rodríguez-Tudela

### 15b.1. Introducción

El EUCAST es un organismo europeo, creado por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), cuya función primordial es el desarrollo de estándares para realizar pruebas de sensibilidad in vitro a los antimicrobianos ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Este comité debe tomar en consideración las metodologías preexistentes en países europeos, lograr el mayor consenso posible entre expertos y las sociedades nacionales, así como intentar que los estándares sean compatibles con los procedimientos de organismos homólogos no europeos, como el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) estadounidense, antes conocido como NCCLS.

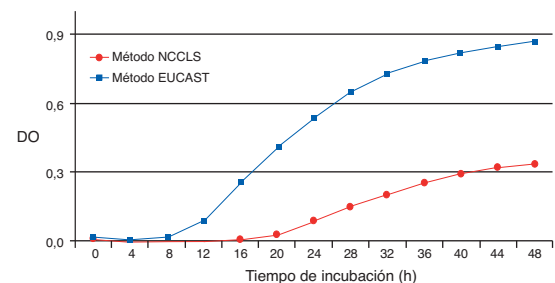
La finalidad de los estándares es establecer puntos de corte que permitan realizar estudios epidemiológicos, con el propósito de vigilar y controlar el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos. En 2002, el EUCAST fue reformado para incluir miembros de cada uno de los países europeos, recibiendo el apoyo financiero de la Dirección General de la Salud y Protección de los Consumidores (DG-SANCO) de la Unión Europea.

Entre 1999 y 2002, el AFST-EUCAST realizó varios estudios experimentales para desarrollar una método de microdilución, que sirviera para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras fermentadoras de la glucosa [1]. Este método se basa en la metodología recogida en el documento M27 del CLSI (versiones A y A2) [2], pero incluyendo modificaciones con la intención de automatizar la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), al sustituir la lectura visual por la espectrofotométrica, y al reducir el tiempo necesario para la obtención de resultados de 48 a 24 h [3].

El estándar del EUCAST fue publicado en 2003 (documento 7.1) [1], y ha mostrado una reproducibilidad elevada (>85%), tanto intra como interlaboratorio, así como una buena correlación con el procedimiento M27-A2 del CLSI [4-6]. Actualmente, el AFST-EUCAST está desarrollando una metodología para realizar estudios de sensibilidad con *Aspergillus* spp. y otra para *Cryptococcus neoformans* y otras levaduras no fermentadoras de la glucosa.

### 15b.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y a pH 7,0. Además, el medio debe complementarse con glucosa hasta alcanzar una concentración del 2% (RPMI-2% glucosa). La adición de glucosa se realiza con la intención de favorecer el crecimiento de las levaduras. Como puede observarse en la [Figura 15b.1](#), la combinación de RPMI-2% glucosa y de un inóculo de  $10^5$  CFU/ml produce una curva de crecimiento con una fase de latencia corta y una gran fase de crecimiento exponencial, que termina alrededor de las 24 h de incubación, momento en que se inicia la fase estacionaria. Estas características cinéticas permiten determinar la CMI a las 24 h de incubación, mientras que con el método del CLSI, el crecimiento a las 24 h es escaso para la mayoría de las cepas, por lo que los resultados deben obtenerse tras 48 h de incubación.



**Figura 15b.1.** Curva de crecimiento de 80 cepas clínicas de *Candida* spp. Comparación entre la metodología del CLSI (RPMI e inóculo de  $10^5$  CFU/ml) y la del EUCAST (RPMI-2% glucosa y  $10^5$  CFU/ml). DO: densidad óptica a 530 nm.

El documento del EUCAST aconseja preparar el medio a doble concentración, ya que tras la adición del inóculo se produce una dilución un medio. Para preparar un litro de medio de cultivo se debe añadir los componentes descritos en la [Tabla 15b.1](#), a 900 ml de agua destilada.

**Tabla 15b.1. Componentes del medio de cultivo recomendado por el EUCAST.**

Componentes	Concentración 1x	Concentración 2x
RPMI 1640	10,4 g	20,8 g
MOPS	34,53 g	69,06 g
Glucosa	18 g	36 g

### 15b.3. Preparación de los antifúngicos

Los antifúngicos deben obtenerse en forma de polvo valorado solicitándolo al laboratorio que los produce o en aquellos casos en los que sea posible, comprándolos a un distribuidor acreditado. Debe conocerse el número de lote, potencia, fecha de caducidad y condiciones de conservación. Las preparaciones clínicas no deben emplearse.

Las soluciones madre deben prepararse según la fórmula incluida en la [Figura 15b.2](#), y deben obtenerse tomando en cuenta las concentraciones a las que se quieren preparar las placas para los estudios de sensibilidad.

Se recomienda pesar, al menos, 100 mg de polvo valorado en balanza de precisión, para disminuir al máximo los errores de pesado. Las soluciones madre deben prepararse a una concentración 100 veces superior a la concentración más elevada que se quiera incluir en el estudio de sensibilidad ([Tabla 15b.2](#)). En la [Tabla 15b.2](#), se muestran los disolventes que pueden utilizarse con cada antifúngico y las concentraciones recomendadas de las soluciones madre, para estudios clínicos rutinarios. Si se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), los tubos deben ser de vidrio.

El documento 7.1 describe el procedimiento para realizar estudios de sensibilidad con 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. La anfotericina B no fue incluida, ya que existen ciertas dudas sobre si los estudios de sensibilidad con RPMI sirven para detectar la resistencia a este polieno. No obstante, varios estudios han demostrado que el método del EUCAST puede emplearse en los estudios con este antifúngico, ya que produce resultados comparables a los obtenidos con el documento del CLSI [3,7]. También se han realizado estudios con voriconazol, con resultados similares [8].

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

**Figura 15b.2.** Fórmula para preparar las soluciones madre a la concentración de trabajo requerida.

Habitualmente, no es necesario esterilizar las soluciones, pero si se tienen dudas sobre la esterilidad de la misma, pueden utilizarse filtros de membrana. No deben emplearse otros materiales ya que pueden absorber cantidades significativas del antifúngico. Los viales con las soluciones madre pueden conservarse a una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  o inferior, pero no más de seis meses. Una vez descongelados los viales no deben recongelarse otra vez.

El intervalo de concentraciones a dispensar en las placas puede variar según los estudios. Generalmente, se recomiendan diluciones dobles basadas en una concentración de 1 mg/l. En la [Tabla 15b.2](#) se incluyen los intervalos de concentraciones recomendados para hacer pruebas de sensibilidad con *Candida* spp.

### 15b.4. Preparación de las placas de antifúngicos

Las placas deben ser de microdilución, estériles, con 96 pocillos de fondo plano. Las placas deben rellenarse con medio de cultivo a concentración doble (2x), ya que al ser inoculadas se producirá una dilución de un medio. El EUCAST recomienda dos formas diferentes de preparación según el tipo de antifúngico.

**Tabla 15b.2. Resumen para la preparación de los antifúngicos en estudios de sensibilidad.**

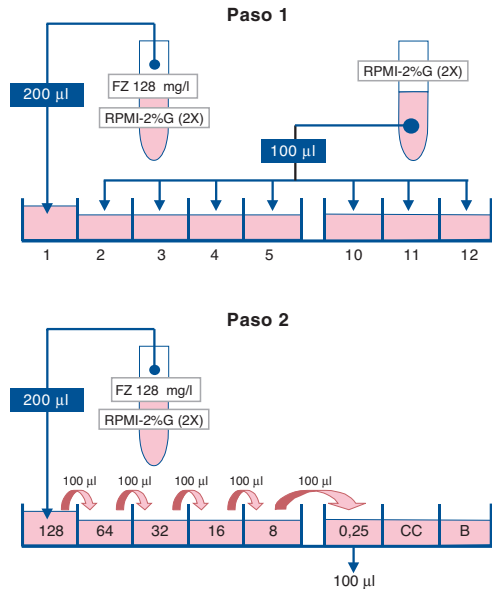
Antifúngico	Disolvente	Concentración de la solución madre (mg/l)	Intervalos de concentración recomendados (mg/l)
Anfotericina B	DMSO	3.200	0,03 - 16
5-Fluorocitosina	DMSO ó 50:50 acetona:agua	12.800	0,125 - 64
Fluconazol	Agua	12.800	0,125 - 64
Itraconazol	DMSO	1.600	0,015 - 8
Ketoconazol	DMSO	1.600	0,015 - 8
Voriconazol	DMSO	1.600	0,015 - 8

DMSO: Dimetilsulfóxido

### 15b.4.1. Preparación de placas de antifúngicos hidrófilos

De esta forma se preparan las placas de fluconazol y de 5-fluorocitosina.

1. Para obtener los intervalos expuestos en la [Tabla 15b.2](#), la solución madre debe ser diluida 100 veces en RPMI-2% glucosa 2x, obteniéndose una solución de trabajo a una concentración de 128 mg/l.
2. Tras ello, se dispensan 200 µl de la solución de trabajo en la columna número 1 de la placa de microdilución. Las columnas 2 a la 12 se rellenan con 100 µl de RPMI-2% glucosa 2x sin antifúngico ([Figura 15b.3](#); paso 1).
3. A continuación, se toman 100 µl de la columna 1 y se transfieren a la columna 2. Luego, se toman 100 µl de la 2 (que ahora tiene 200 µl) y se pasan a la 3, y así hasta llegar a la columna 10 ([Figura 15b.3](#); paso 2).
4. Los últimos 100 µl recogidos en la columna 10 se desechan.
5. En las columnas 11 y 12 no se dispensa antifúngico, ya que se utilizarán como control de crecimiento (CC) y control de esterilidad (B).
6. Las placas pueden almacenarse a -70 °C durante seis meses o a -20 °C durante un mes. Las placas deben mantenerse selladas en plástico o papel aluminio mientras estén congeladas.

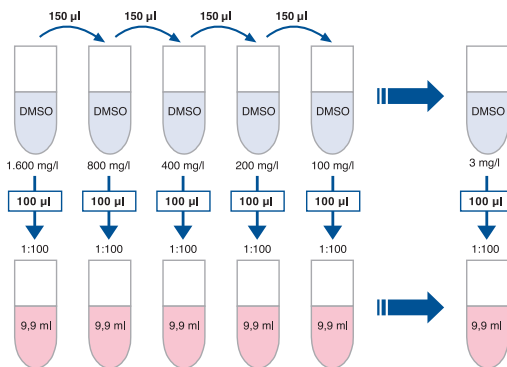


**Figura 15b.3.** Preparación de la placas de microdilución de antifúngicos hidrófilos (se toma fluconazol a modo de ejemplo).

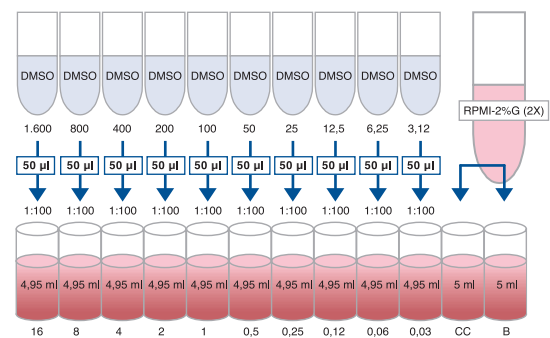
### 15b.4.2. Preparación de placas de antifúngicos hidrófobos

De esta forma se preparan las placas de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y voriconazol:

1. Se toma una alícuota de solución madre.
2. Se llenan 9 tubos más con 150 µl de DMSO (los tubos deben de ser de vidrio).
3. Se toman 150 µl de la solución inicial del antifúngico y se hacen diluciones consecutivas 1:2, en los 9 tubos.
4. A continuación, se llenan 10 tubos con 9,9 ml de RPMI-2% glucosa 2x.
5. Se traspasan 100 µl de cada uno de los tubos con diluciones dobles del antifúngico en DMSO, a los tubos con RPMI, obteniéndose diluciones 1:100 del antifúngico ([Figura 15b.4](#)).
6. Un método alternativo es utilizar un reservorio para pipetas con doce pocillos de 5 ml ([Figura 15b.5](#)).
7. Tras ello, se dispensan 100 µl en la primera columna de la placa de microdilución, del primer tubo o del primer depósito del reservorio, otros 100 µl en la segunda columna desde el segundo tubo o segundo depósito, otros 100 µl



**Figura 15b.4.** Preparación de las soluciones de trabajo para preparar placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos (solución madre de 1.600 mg/l, a modo de ejemplo).



**Figura 15b.5.** Método alternativo para preparar las soluciones de trabajo para preparar placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos.

## Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)

- en la tercera columna desde el tercer tubo o tercer depósito, y así, hasta la columna 10 (Figura 15b.6).
8. En las columnas 11 y 12 se añaden 100 µl en cada pocillo de RPMI-2% glucosa 2x sin antifúngico.

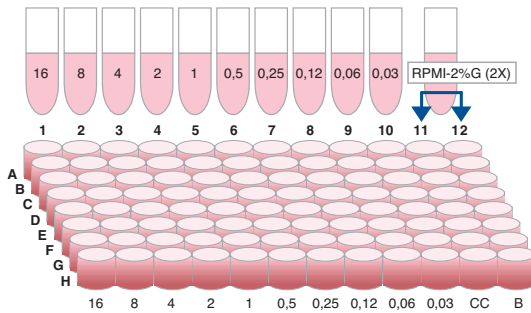


Figura 15b.6. Llenado de las placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos.

### 15b.5. Preparación del inóculo de *Candida* spp.

El inóculo se prepara de la siguiente forma:

1. Un día antes de hacer el estudio de sensibilidad, las levaduras se subcultivan en agar glucosado de Sabouraud o en agar glucosado de peptona, y se incuban 18-24 h, a 35-37 °C.
2. El inóculo se prepara picando cinco colonias distintas, de 1 mm de diámetro, y resuspendiéndolas en 5 ml de agua destilada.
3. La suspensión se homogeniza con un agitador de sobremesa a 2.000 rpm, durante 15 segundos.
4. El inóculo se ajusta a un 0,5 McFarland (mediante escala o turbidímetro) con agua destilada. Tras ello, se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a 530 nm (la densidad óptica será de 0,09-0,13), lo que equivale a una suspensión de levaduras de  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml.
5. Por último, se hace una dilución 1:10 en agua destilada, preparando la suspensión de trabajo que tendrá  $1-5 \times 10^5$  UFC/ml.

### 15b.6. Inoculación e incubación de las placas de microdilución

En cada placa pueden estudiarse hasta ocho cepas, una por fila, recordando que en todas las placas debería incluirse, al menos, una cepa control de calidad. Cada pocillo es inoculado con 100 µl de las suspensiones de trabajo (Figura 15b.7), por lo que todos los pocillos se diluyen a la mitad, de ahí la utilización del RPMI a doble concentración. La columna 11 también se inocula con 100 µl, ya que es el control de crecimiento. A la columna 12 se añaden 100 µl de agua destilada, ya que es el control de esterilidad y el blanco.

Las placas se incuban a 35-37 °C en estufa con ambiente normal (sin CO<sub>2</sub>), durante 24 h.

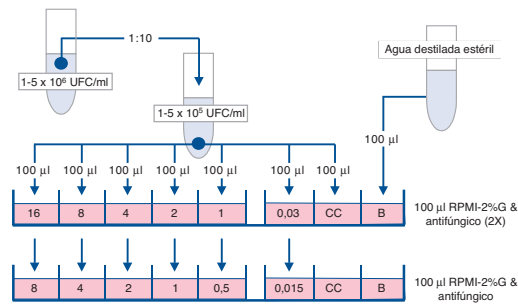


Figura 15b.7. Inoculación de las placas de microdilución.

### 15b.7. Lectura de los resultados

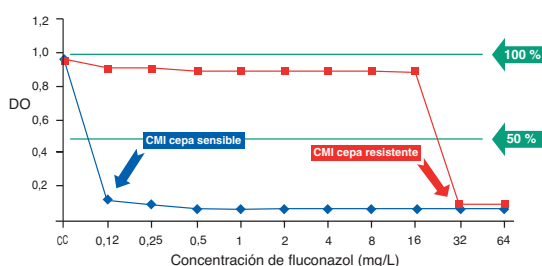
Las placas deben leerse en un lector de placas de microdilución, en el que se detecte la densidad óptica de los pocillos. La longitud de onda recomendada es de 530 nm, al igual que al preparar el inóculo, pero también pueden emplearse otras longitudes de onda [9]. El valor de densidad óptica de los pocillos de la columna 12 (blanco) debe sustraerse siempre a las lecturas del resto de los pocillos. Las placas pueden agitarse si se desea antes de la lectura, pero al ser de fondo plano, no suele formarse botón en el centro del pocillo, por lo que la lectura no necesita de homogenizado previo.

El subcomité de EUCAST recomienda que si el control de crecimiento no supera 0,5 de densidad óptica, las placas deben reincubarse otra vez y determinar la CMI a las 48 h. No obstante, una densidad óptica de 0,2 es suficiente para determinar la CMI, por lo que es probable que se incluya este valor en las siguientes versiones del documento.

La CMI de los antifúngicos se determina de la siguiente forma:

- \* *5-fluorocitosina* y *azoles*: es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 50%, con respecto a la del control de crecimiento.
- \* *Anfotericina B*: es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 90%, con respecto a la del control de crecimiento.

En la Figura 15b.8 se incluye una representación de cómo pueden calcularse las CMI con los valores de la lectura espectrofotométrica. La figura muestra las curvas de inhibición de dos cepas, una sensible y otra resistente, frente a fluconazol. Las curvas de inhibición se construyen con los valores de densidad óptica en cada pocillo de la fila inoculada con la levadura, tomando en consideración que en cada pocillo hay una concentración del fármaco en cuestión. La densidad óptica del pocillo control de crecimiento (CC) es el 100% del crecimiento, siendo el punto de referencia para los cálculos.



**Figura 15b.8.** Cálculo de la CMI tras la lectura espectrofotométrica. La figura representa una cepa de *Candida albicans* sensible a fluconazol (en azul) y otra resistente (en rojo). DO: Densidad óptica; CC: Control de crecimiento.

En la cepa sensible, el valor de densidad óptica del CC es de 0,96, por lo que el 50% de inhibición es 0,48; el primer pocillo en el que se inoculó la cepa con una DO por debajo de ese valor, es el que corresponde con la concentración de 0,12 mg/l, siendo esa la CMI. En el caso de la cepa resistente, el valor del pocillo CC es de 0,94, por lo que buscamos un pocillo por debajo de 0,47, siendo el que corresponde a la concentración de 32 mg/l.

## 15b.8. Interpretación de los resultados

Aún no se han propuesto los puntos de corte para interpretar los resultados obtenidos con la metodología EUCAST. Debe destacarse que los puntos de corte del CLSI, recomendados para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, no pueden utilizarse para el método del EUCAST. Esto se debe a que la metodología europea recomienda la lectura a las 24 h de incubación, mientras que la estadounidense aconseja a las 48 h. Este cambio en el tiempo de lectura produce algunas diferencias sustanciales entre ambos métodos, sobretodo en las cepas con crecimiento residual (*trailing*) y en algunos organismos resistentes [5].

El EUCAST está inmerso, actualmente, en el proceso de definición de los puntos de corte. Para ello, se están utilizando distribuciones de CMI de cepas clínicas, obtenidas por la metodología EUCAST. Se realizan análisis epidemiológicos, observando como se distribuye la población de cepas de cada una de las especies, para definir qué cepas pertenecen a la población salvaje (*wild type*), es decir, aquellas cepas que no han desarrollado mecanismos de resistencia. Los resultados se relacionan con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antifúngicos. Tras ello, si se observan cepas con CMI significativamente más elevadas que la mayoría de los miembros de su especie, y esas CMI se sitúan por encima de los valores de las variables farmacocinéticas críticas de cada antifúngico, se propondrán los puntos de corte. Para una mayor información consultar en [www.eucast.org](http://www.eucast.org).

Hasta la fecha, el subcomité ha recogido las CMI de más de 5.000 cepas, ha depurado y tabulado los datos, y está analizando las distribuciones poblacionales, por lo que es probable que pronto se propongan puntos de corte.

En caso de utilizar el método EUCAST, las recomendaciones actuales para interpretar los resultados son considerar como resistentes in vitro, aquellas cepas que muestran una CMI significativamente más elevada que los miembros de su especie. Así por ejemplo, CMI de fluconazol por encima de 16 mg/l o de anfotericina B por encima de 1 mg/l podrían considerarse como resistentes in vitro.

### 15b.9. Control de calidad

El control de calidad se realiza de forma similar al descrito en documentos publicados previamente, particularmente el M23-A y el M27-A2 del CLSI [2,10]. El subcomité del EUCAST está realizando un estudio multicéntrico para establecer cepas control de calidad. Hasta ese momento, el subcomité recomienda utilizar las cepas cuyos valores control se recogen en la [Tabla 15b.3](#). Estos valores fueron establecidos en un trabajo preliminar realizado en nueve laboratorios [6].

El subcomité recomienda mantener las cepas control de calidad a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Si se quieren mantener

almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservar a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 días. Tras esas dos semanas deben subcultivarse de nuevo.

Las cepas control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMI están dentro del intervalo de control. Si la CMI de la cepa control no se incluye en el intervalo en más de una ocasión, tras repetir el test 20 veces en días distintos, debe analizarse todo el método en busca del error.

Por último, se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución.

**Tabla 15b.3. Valores para realizar el control de calidad.**

Cepa	Antifúngico	Media geométrica	Moda	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo Control de Calidad	% cepas dentro del intervalo	Valores del CLSI
ATCC 6258	5FC	2,6	2	2	1	8	1 - 4	97	8 - 32
<i>C. krusei</i>	FLZ	25,7	16	32	8	32	8 - 32	100	16 - 128
	ITZ	0,12	0,12	0,12	0,03	0,5	0,06 - 0,25	95	0,25 - 1
ATCC 22019	5FC	0,25	0,25	0,25	0,12	0,5	0,12 - 0,5	100	0,12 - 0,5
<i>C. parapsilosis</i>	FLZ	1,51	2	2	1	4	1 - 4	100	1 - 4
	ITZ	0,07	0,06	0,06	0,03	0,25	0,03 - 0,12	97	0,12 - 0,5

### Referencias

- Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning D, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: I-VIII.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 525-532.
- Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antifungal Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3841-3844.
- Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, Rodríguez-Tudela JL. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3644-3647.
- Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodríguez-Tudela JL; AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 467-474.
- Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 981-987.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Garcia-Effron G, Rodríguez-Tudela JL. In vitro activities of ravuconazole and four other antifungal agents against fluconazole-resistant or -susceptible clinical yeast isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3107-3111.
- Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2513-2517.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved standard M23-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1994.