

Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras

*M. C. Arendrup¹, M. Cuenca-Estrella², C. Lass-Flörl³, W. Hope⁴ and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)**

*EUCAST-AFST: MC Arendrup¹ (Chairman, Denmark), WW Hope⁴ (Secretary), C Lass-Flörl³ (Steering Committee, Austria), M Cuenca-Estrella² (Steering Committee, Spain), S Arikan-Akdagli⁵ (Turkey), F Barchiesi⁶ (Italy), J Bille⁷ (Switzerland), E Chryssanthou⁸ (Sweden), P Gaustad⁹ (Norway), A Groll¹⁰ (Germany), P Hamal¹¹ (Czech Republic), H Järv¹² (Estonia), N Klimko¹³ (Russia), K. Lagrou¹⁴, O. Lortholary¹⁵ (France), CB Moore⁴ (UK), A Velegriaki¹⁶ (Greece), P Verweij¹⁷ (The Netherlands).

¹Unit of Mycology, Dept Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark,

²Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain,

³Division of Hygiene and Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria,

⁴The University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, NIHR, Translational Research Facility in Respiratory Medicine, University Hospital of South Manchester NHS Foundation Trust, Manchester, UK

⁵Hacettepe University Medical School, Department of Medical Microbiology, Mycology Laboratory, Ankara, Turkey

⁶Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy,

⁷University Hospital, Lausanne, Switzerland,

⁸Dept Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden,

⁹Dept. Clinical Microbiology, Rikshospitalet, Oslo, Norway

¹⁰ Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and Department of Pediatric Hematology/Oncology, University Children's Hospital Muenster, Germany

¹¹Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc & University Hospital Olomouc, Czech Republic

¹²Tartu University Hospital, Tartu, Estonia

¹³ Dept. of Clinical Mycology, Nord-West Medical University 1/28 Santiago de Cuba str. Saint Petersburg, Russia

¹⁴Dept. of Medical Diagnostic Sciences, UZ Leuven, Leuven, Belgium

¹⁵Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques, Unité de Mycologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France,

¹⁶Mycology Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

¹⁷Radboud University Nijmegen Medical Centre & Nijmegen University Centre for Infectious Diseases, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands,

Corresponding author and reprint requests: M.C. Arendrup, Unit of Mycology building 43/117, Dept Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institute, Ørestads Boulevard 5, DK-2300 Copenhagen, Denmark. Email maca@ssi.dk

Running heading: EUCAST antifungal MIC method for yeasts

INTRODUCCION

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos deben realizarse en aquellos hongos causantes de enfermedad, especialmente si la infección es grave, es refractaria al tratamiento en pacientes previamente expuestos a antifúngicos o está causada por especies raras. Estas pruebas son también importantes para vigilar la resistencia, realizar estudios epidemiológicos y para comparar la actividad *in vitro* de nuevos antifúngicos con los ya existentes.

Los métodos de dilución se usan para establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antimicrobianos. Dichos métodos son de referencia para los test de sensibilidad antimicrobiana y se usan principalmente para definir la actividad de los nuevos antifúngicos y para confirmar la sensibilidad de organismos que dan resultados equívocos o poco fiables en las pruebas de rutina. Estos métodos se basan en la capacidad de los hongos de crecer en los pocillos de placas de microdilución las cuales contienen medio de cultivo líquido y diluciones seriadas de los antimicrobianos (dilución en caldo). La CMI se define como la concentración más baja de un antifúngico (en mg/L) que inhibe el crecimiento. La CMI proporciona información sobre la sensibilidad o resistencia del organismo al antifúngico y ayuda a la toma de las decisiones terapéuticas correctas.

El método descrito en este documento se utiliza para analizar la sensibilidad de levaduras importantes desde el punto de vista clínico (principalmente *Candida* y *Cryptococcus* spp.).

ALCANCE

El método estándar descrito aquí está validado para analizar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos por determinación de la CMI. Las CMIs indican la actividad de un antifúngico dado en las condiciones descritas y pueden usarse para la toma de decisiones relativas al manejo del paciente una vez que se han tenido en cuenta otros factores p. ej: farmacocinética, farmacodinamia y mecanismos de resistencia. La CMI permite clasificar a los hongos en “sensible” (S), “intermedio” (I), o “resistente” (R) a un determinado agente cuando se han definido los puntos de corte clínicos. Además, la distribución de las CMIs puede usarse para definir poblaciones “*wild-type*” o “*non-wild-type*” y, de este modo, identificar aislados con CMIs por encima

del valor del *epidemiological cut-off* (ECOFF, punto de corte epidemiológico) (definido como el límite superior de la población silvestre o salvaje) y que probablemente tengan mecanismos de resistencia.

Este método está pensado principalmente para facilitar un grado aceptable de concordancia o acuerdo entre laboratorios en la medición de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos dentro de los rangos especificados. El método se ha diseñado de manera que sea de fácil realización, rápido, económico y adecuado para que las lecturas de las placas de microdilución puedan ser transferidas y almacenadas y los datos obtenidos se analicen por ordenador. Además, se diferencia del procedimiento recogido en el documento M27 del estadounidense CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) sobre pruebas de sensibilidad de levaduras [(1)], en que recomienda una concentración de glucosa más elevada en el medio (para optimizar el crecimiento), un mayor inóculo (lo que asegura la lectura a las 24 horas para la mayoría de las especies) y placas con pocillos de fondo plano para permitir la lectura espectrofotométrica en lugar de la lectura visual para la determinación de los puntos finales (endpoints). La primera versión del documento se publicó como un documento de discusión (7.1) en 2003 [(2)] y en 2008 [(3)] se publicó el documento definitivo. El presente documento es una actualización de la primera versión y contiene nueva información relacionada con disolventes para caspofungina, micafungina y fluconazol, vida útil de las placas que contienen equinocandinas, pruebas de *Cryptococcus* spp. e intervalos de CMI de referencia para las cepas control de calidad para anidulafungina.

TERMINOS Y DEFINICIONES

Antifúngico

Un antifúngico es una sustancia de origen biológico, semisintético o sintético que inhibe el crecimiento de los hongos o es letal para ellos. Desinfectantes, antisépticos y conservantes no están incluidos en esta definición.

Potencia

La potencia es la fracción biológicamente activa de una sustancia determinada, obtenida en un bioensayo contra un polvo de referencia de la misma sustancia. La potencia se expresa como una fracción de masa, en miligramos por gramo (mg/g), como actividad en unidades internacionales (UI) por gramo, como una fracción de

masa o de volumen en porcentaje, o como una concentración (fracción de masa) en moles por litro de ingrediente.

Concentración

Concentración es la cantidad de agente antimicrobiano en un volumen definido de líquido. La concentración se expresa en unidades SI como mg/L. Aunque mg/L es equivalente a $\mu\text{g/mL}$, el uso de este último no se recomienda.

Solución stock (solución *madre*)

Una solución stock es una solución inicial que se emplea para realizar diluciones adicionales.

CMI

La CMI es la menor concentración de antifúngico que inhibe el crecimiento de un microorganismo en un periodo definido de tiempo. Se expresa en mg/L.

Punto de corte

Los puntos de corte son valores de CMI específicos que permiten clasificar los hongos en las siguientes categorías “sensible”, “intermedio” y “resistente”. Los puntos pueden cambiar debido a cambios en determinadas circunstancias (Ej: cambios en las dosis habituales de los fármacos).

Sensible (S): Una cepa que se inhibe *in vitro* por una concentración de un antifúngico que se asocia con una alta probabilidad de éxito terapéutico. Los hongos se clasifican en sensibles al aplicar los puntos de corte adecuados en un test fenotípico definido.

Intermedio (I). Una cepa inhibida *in vitro* por una concentración de antifúngico asociada con un efecto terapéutico dudoso. Las cepas fúngicas se clasifican como intermedias aplicando los puntos de corte apropiados en un test fenotípico definido. La sensibilidad intermedia implica que una infección causada por una cepa puede ser tratada con eficacia en lugares del cuerpo donde el fármaco está concentrado fisiológicamente o cuando pueden emplearse altas dosis de antifúngico. Esta categoría también delimita una *zona buffer* o indeterminada, para prevenir que pequeños factores técnicos no controlados causen discrepancias en las interpretaciones.

Resistente (R): Una cepa fúngica inhibida *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia con una alta probabilidad de fallo terapéutico. Las cepas fúngicas se clasifican en resistentes aplicando los puntos de corte apropiados en un test fenotípico definido.

Cepa salvaje o silvestre

El término cepa salvaje o silvestre se refiere a un aislado que carece de mecanismos de resistencia adquirida al agente antifúngico.

Cepa control

El término cepa control se refiere a una cepa catalogada, caracterizada y con fenotipos y/o genotipos estables y definidos respecto a la sensibilidad a los antifúngicos. Dichas cepas se obtienen de colecciones de cultivos certificadas y se usan como controles de calidad.

Dilución en caldo

El método de dilución en caldo es una técnica en la cual se realizan diluciones seriadas (usualmente dobles) del antifúngico en un medio líquido, el cual se inocula con un número estandarizado de microorganismos y se incuba durante un tiempo determinado. El objetivo de este método es la determinación de la CMI.

Microdilución

Cuando el método de dilución en caldo se realiza en placas que contienen pocillos con una capacidad aproximada de 300 μ l/pocillo se denomina como microdilución en caldo.

Caldo

El término caldo se refiere al medio líquido empleado para el crecimiento *in vitro* de los hongos.

Inóculo

El número de unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC) en un volumen definido. El inóculo se expresa en UFC/mL.

PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

La técnica se realiza en placas de microdilución. El método se basa en la preparación de las soluciones de trabajo del antifúngico en 100 µl de volumen por pocillo (con la adición del inóculo también en un volumen de 100 µl).

Medio

Se emplea un medio totalmente sintético, RPMI-1640 con glutamina (Tabla 1) y suplementado con glucosa en una concentración final de 20g/L (2%). Se recomienda un indicador de pH sin bicarbonato [(4-6)]. Se prefieren tampones zwitteriónicos al uso del Tris, que es antagónico con la actividad de la fluorocitosina, y también al tampón fosfato, el cual da interacciones inesperadas con los antifúngicos. El tampón 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) en una concentración final de 0,165 mol/L, pH 7.0 es el más satisfactorio para el RPMI 1640. El medio recomendado, RPMI con 2% de glucosa se prepara de la siguiente manera:

1. Añadir los componentes que aparecen en la Tabla 2 a 900 ml de agua destilada
2. Agitar hasta que los componentes están totalmente disueltos
3. Ajustar el pH a 7,0 a 25°C con 1M de hidróxido sódico
4. Añadir agua hasta un volumen final de 1 litro
5. Esterilizar por filtración usando un filtro de 0,22 µm
6. Almacenar a 4°C
7. A efectos de control de calidad, usar un alícuota del medio esterilizado para los controles de esterilidad, para comprobar el pH (6,9-7,1 es aceptable) y para realizar un control de crecimiento con una cepa de referencia.

Medio para Anfotericina B

Hasta el momento se recomienda que el RPMI 2% G se use también para anfotericina B. El caldo no-sintético AM3 (medio para antibióticos nº 3), suplementado con glucosa al 2% de concentración final, se ha evaluado para detectar la resistencia a anfotericina B [(7-10)]. Sin embargo, en este medio existen variaciones entre lotes y también variaciones en el rendimiento entre distintos fabricantes. Además, resultados

preliminares indican que un inóculo de $0,5-2,5 \times 10^5$ ufc/ml es demasiado alto para anfotericina B en AM3 [(7)].

Antifúngicos

Todas las soluciones de antifúngicos deben prepararse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. El polvo valorado de antifúngico debe obtenerse directamente del fabricante o de fuentes comerciales fiables. No se deben usar preparaciones clínicas porque con frecuencia contienen excipientes que pueden interferir con los test de sensibilidad. El polvo valorado de antifúngico debe ser suministrado con el nombre genérico del fármaco, el número de lote, potencia, fecha de caducidad y recomendaciones sobre las condiciones de almacenamiento. Se deben almacenar en contenedores sellados a -20°C o inferior y con un desecante, a menos que lo recomiende de otro modo el fabricante. Lo ideal es que se repartan en alícuotas, cada una de las cuales se utilizará en cada ocasión. Los recipientes se deben llevar a temperatura ambiente antes de abrir, para evitar condensación de agua sobre el polvo

Preparación de las soluciones stock

Las soluciones de antifúngicos deben prepararse teniendo en cuenta la potencia del lote del polvo valorado. La cantidad de polvo y de solvente necesario para preparar una solución standard se calcula como sigue:

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

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

Se debe pesar el polvo de antifúngico en una balanza de precisión que haya sido calibrada hasta dos decimales cuando se pesan 100 mg. Se recomienda pesar al menos 25 mg de polvo valorado. El proveedor debe proporcionar información sobre la solubilidad de los antifúngicos. Para disolver ciertos antifúngicos no se emplea agua, es necesario emplear otros solventes (Tabla 3). Generalmente no es necesario esterilizar las soluciones stocks, pero se pueden emplear membranas de filtración. Deben evitarse otros materiales para el filtrado ya que pueden retener cantidades significativas de antifúngico. Cuando se emplea un sistema de filtración, es necesario obtener muestras antes y después del filtrado para probarlas y asegurarse de que el fármaco no se ha quedado retenido en el filtro. A menos que se indique de otro modo por el fabricante, se deben almacenar las soluciones de antifúngico en pequeños volúmenes, en viales de polipropileno o polietileno estériles a -70°C o inferior. Pueden almacenarse a -70°C al menos durante seis meses sin pérdida significativa de actividad [(11, 12)]. Una vez descongelados, los viales de -70°C deben usarse el mismo día. Debe desecharse lo que sobra y no va ser utilizado el mismo día. El deterioro significativo del antifúngico se verá reflejado en los resultados de los test de sensibilidad para las cepas de control de calidad (Tabla 6). Si es necesario, se puede analizar el antifúngico para determinar la potencia.

Preparación de las soluciones de trabajo

El rango de concentraciones a probar dependerá del organismo y del antifúngico. El rango de concentraciones debe abarcar el punto de corte, si éste existe, así como los resultados esperados para las cepas del control de calidad. Los rangos de concentración de fármaco recomendados son los que aparecen en la Tabla 3. Se preparan diluciones seriadas dobles partiendo de 1mg/L en 2x RPMI 2%G. El medio RPMI 2%G se usa en una concentración 2x para permitir una dilución del 50% después de la adición del inóculo, preparado en agua destilada.

Las diluciones se deben preparar de acuerdo a las recomendaciones ISO [(13)]. Pueden emplearse esquemas alternativos de diluciones si se demuestra que se realizan tan bien como el método de referencia [(14)]. Por ejemplo, en la Tabla 4 se muestra una alternativa que utiliza volúmenes menores para preparar diluciones seriadas con una concentración final de 0,125-64 mg/L (ver la Tabla 3 para verificar los solventes necesarios para cada antifúngico). Un resumen de los pasos para preparar las soluciones de trabajo (2x concentración final) en este esquema alternativo es el siguiente:

1. Tomar un tubo de antifúngico del congelador de -70°C .
2. Añadir los volúmenes apropiados de solvente (consultar la Tabla 3 para los solventes y la Tabla 4 para los volúmenes de solventes) en otros nueve tubos
3. Seguir los pasos descritos en la Tabla 4 para realizar diluciones seriadas que lleguen a 200 veces de concentración final. Se necesitarán esquemas similares de dilución con una concentración stock de 3200 mg/L o 1600 mg/L en el paso 1 de la Tabla 4, para series de diluciones desde 0,03-16 mg/L y 0,015-8 mg/L respectivamente.
4. Añadir 9,9 ml de medio 2x RPMI 2%G a 10 tubos.
5. Tomar 100 μl de cada uno de los tubos con 200x de concentración final de fármaco antifúngico disuelto y transferirlo a 10 tubos con 9,9 ml de medio de cultivo (dilución 1:100). La concentración de solvente en los tubos de medio de cultivo es 1% y la concentración de agente antifúngico es 2x de la concentración final.

Preparación de las placas de microdilución

Usar placas desechables, estériles, de 96 pocillos con fondo plano y con una capacidad de aproximadamente 300 μl . En la placa de microdilución, para cada columna de 1 a 10, dispensar 100 μl de cada uno de los tubos que contienen la concentración 2x del antifúngico. Por ejemplo, con itraconazol, voriconazol y posaconazol dispensar a la columna 1 el medio que contiene 16 mg/L, a la columna 2 el medio conteniendo 8 mg/L, y en la columna 10 el medio que contenía 0,03 mg/L. A cada pocillo de la columna 11 y 12 añadir 100 μl de medio 2x RPMI 2% G. De este modo cada pocillo de las columnas 1 a 10 contendrá 100 μl de fármaco antifúngico concentrado al doble en medio 2x RPMI 2% G con 1% de solvente.

Almacenamiento de las placas de microdilución

Las placas se pueden meter en bolsas de plástico o envolver en papel de aluminio y guardar congeladas a -70°C o inferior durante un máximo de seis meses o a -20°C durante un mes como máximo, sin pérdida de potencia del fármaco [(12)]. Una vez que las placas se han descongelado no deben volver a congelarse.

PREPARACION DEL INOCULO

La estandarización del inóculo es esencial para conseguir precisión y reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El inóculo debe prepararse mediante suspensión en agua destilada estéril de cinco colonias representativas, obtenidas de un cultivo de 18-24 horas en agar nutritivo. El inóculo final debe tener entre $0,5 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Método de suspensión de las colonias

1. Cultivar las levaduras a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en un medio agar nutritivo no selectivo (Sabouraud dextrosa agar o Patata dextrosa agar) 18-48 h antes de realizar el ensayo.
2. Preparar el inóculo resuspendiendo cinco colonias distintas, con un diámetro superior a $\geq 1\text{mm}$ de un cultivo de 24 horas en al menos 3 mL de agua estéril.
3. Resuspender uniformemente el inóculo agitando vigorosamente en un vórtex durante 15 s. Ajustar la D.O a 0.5 McFarland (Tabla 5) midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 530 nm de longitud de onda y añadiendo agua estéril cuando sea necesario. Se obtendrá de este modo una suspensión de levaduras de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

***Cryptococcus* spp.**

Cryptococcus spp. son levaduras no fermentadoras. La ausencia de fermentación compromete el crecimiento en placas de microdilución según los protocolos definidos por CLSI y EUCAST. Un reciente y amplio estudio exploró los efectos de la variación en la metodología de las pruebas de sensibilidad EUCAST en comparación con el procedimiento estándar para *Candida* spp. [(15)]. Las modificaciones incluyeron 1) medio de cultivo (RPMI versus Yeast Nitrógeno Base [YNB], 2) concentración de glucosa (0,2 % versus 2%), 3) fuente de nitrógeno (sulfato amónico) 4) temperatura (30°C versus 35°C), 5) agitación y 6) tamaño de inóculo (10^3 , 10^4 y 10^5 células). Se compararon las tasas de crecimiento y las CMIs. Aunque el uso del medio YNB, la reducción de la temperatura de incubación a 30°C y la agitación de las placas durante

la incubación mejoraron el crecimiento, no hubo diferencias significativas en las CMIS obtenidas con los diferentes métodos. Cuando se evaluó la concordancia entre los valores de CMI, se consideró que los valores de CMI que difieren en menos de dos diluciones no presentaban diferencias significativas. Por ello, hoy se recomienda que la metodología EUCAST se adopte para la determinación de *Cryptococcus* spp. y que las placas se lean cuando los valores de DO estén por encima de 0,2. En casos donde el crecimiento es insuficiente se sugiere repetir el test incubando las placas a 30°C.

INOCULACION DE PLACAS DE MICRODILUCION

Las placas de microdilución deben inocularse en los 30 min posteriores a la preparación del inóculo, para mantener la concentración de células viables.

Inocular cada pocillo de la placa con 100 µl de la suspensión de levaduras a una concentración de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. De este modo, se obtendrá la concentración requerida de fármaco así como la densidad del inóculo (inóculo final= $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Hay que inocular también los pocillos correspondientes al control de crecimiento (columna 11), que contienen 100 µl de medio estéril libre de fármaco con 100 µl de la misma suspensión de inóculo. Rellenar la columna 12 de la placa de microdilución con 100 µl de agua destilada estéril del lote empleado para preparar el inóculo como un control del medio y del agua destilada (sólo medio sin fármaco). Realizar un control del organismo usando el mismo método cada vez que se pruebe una nueva cepa.

INCUBACION DE LAS PLACAS DE MICRODILUCION

Incubar las placas sin agitación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en aire ambiente durante 24 ± 2 h. Una absorbancia de $\leq 0,2$ indica escaso crecimiento y se ve sobre todo en cepas de *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii*. Ese tipo de placas se deben incubar de nuevo durante otras 12-24 h y volver a leer. Si no se alcanza la absorbancia de 0,2 al cabo de 48 h se considera una prueba fallida. Como se describió anteriormente, una absorbancia de $\leq 0,2$ después de 48 h para *Cryptococcus* spp. implica la repetición de la prueba incubando a 30°C [(15)].

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Las placas de microdilución hay que leerlas en un lector de placas. La longitud de onda recomendada para medir la absorbancia de la placa es de 530 nm, aunque puede medirse a otras longitudes de onda ej: 405 nm o 450 nm. El valor del blanco debe restarse de las lecturas del resto de pocillos.

Anfotericina B

La CMI de anfotericina B es la concentración más baja que da lugar a una inhibición del crecimiento de $\geq 90\%$ respecto al control sin antifúngico.

Fluorocitosina, azoles y equinocandinas

La CMI de fluorocitosina (5-flucitosina), azoles y equinocandinas es la concentración más baja que da lugar a una inhibición del crecimiento del 50% respecto al control sin antifúngico.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

EUCAST ha recomendado puntos de corte para anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, posaconazol y voriconazol y especies de *Candida*. (<http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>).

CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control son los medios por los que se asegura la calidad de los resultados y el CLSI [(1)] los describe en detalle. La calidad del resultado de las pruebas se controla empleando cepas de control.

Cepas de control

Las CMIs para las cepas de control deberían estar idealmente cerca del punto medio del rango de las concentraciones probadas y el patrón de sensibilidad a los antifúngicos debe ser estable. Las cepas de control recomendadas aparecen en la Tabla 6 y se seleccionaron de acuerdo a dichos criterios [(16,17)]. Un estudio reciente

ha señalado que las dos cepas más comúnmente usadas como controles *C. parapsilosis* ATCC22019 y *C. krusei* ATCC6258 no son suficientemente sensibles para detectar variaciones en la potencia de caspofungina y que las cepas *C. albicans* ATCC64548 o *C. albicans* 64550 son superiores para este fin [(12)]. Las cepas control se deben obtener de una fuente fiable como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), la Colección Nacional de Patógenos Fúngicos (NCPF), el Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) o proveedores comerciales que ofrezcan garantías similares de calidad.

Almacenaje de las cepas de control

Las levaduras pueden guardarse liofilizadas o congeladas a -70°C o inferior [(18)]. Los cultivos se pueden almacenar a corto plazo en tubos inclinados de Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Patata Dextrosa entre 2 y 8°C, preparando cultivos nuevos cada dos semanas a partir de los stocks congelados.

Recomendaciones generales y uso de las cepas control en rutina

Para el uso de rutina de las cepas control, hay que preparar cultivos frescos en medio agar nutritivo (Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Patata Dextrosa) a partir de cultivos en tubos inclinado, congelados o liofilizados.

1. Hay que incluir al menos dos cepas control cada día que se realiza el test y las CMIs deben estar en los rangos control que aparecen en la Tabla 6. Si más de una de cada 20 pruebas realizadas está fuera de rango es necesario investigar la fuente de error.
2. Cada test debe incluir un pocillo de medio sin antifúngico para probar el crecimiento del microorganismo y proporcionar un control de turbidez para la lectura de los puntos finales.
3. Subcultivar el inóculo en el medio de cultivo adecuado (preferiblemente un medio cromogénico) para asegurarse de la pureza y para proporcionar colonias frescas en caso de que sea necesario repetir el test.

4. Probar cada nuevo lote de medio, de placas de microdilución y lote de RPMI 1640 2%G al menos con dos cepas del control de calidad (Tabla 6) para asegurar que las CMI's están en el rango esperado.

REFERENCES

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document M27-A3[28]. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.
2. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9(8):i-viii.
3. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(4):398-405.
4. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 Jan;37(1):39-45.
5. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 Sep;34(9):1648-54.
6. Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 Jan;38(1):45-8.
7. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jul;45(7):2070-4.
8. Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1997 Jan;35(1):270-2.
9. Rex JH, Cooper CR, Jr., Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Apr;39(4):906-9.
10. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Nov;39(11):2520-2.
11. Anhalt JP, Washington JA. Preparation and storage of antimicrobials. In: Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy H, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 1199-200. Page 15 of 21
12. Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. using the EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: Analysis

- of the influence of Bovine Serum Albumin Supplementation, Storage Time and Drug Lots. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jan 18;55(4):1580-7.
13. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - part 1: reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: ISO; 2006.
 14. Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Lass-Floerl C, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Multicenter Comparison of the ISO Standard 20776-1 and the Serial 2-Fold Dilution Procedures to Dilute Hydrophilic and Hydrophobic Antifungal Agents for Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol* 2010 Mar 10.
 15. Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gomez-Lopez A, Bernal-Martinez L, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Nonfermentative Yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011 Apr 1;55(4):1563-70.
 16. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006 Mar;44(3):819-26.
 17. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, 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 May;33(5):1104-7.
 18. Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmstrom A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards--recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996 Apr;34(4):816-7.

Tabla 1. Composición del medio RPMI 1640

Componente	g/L
L-arginina (base libre)	0,200
L-asparagina (anhidrido)	0,050
L-ácido aspártico	0,020
L-cisteina 2HCl	0,0652
L-ácido glutámico	0,020
L-glutamina	0,300
Glicina	0,010
L-histidina (base libre)	0,015
L-hidroxiprolina	0,020
L-isoleucina	0,050
L-leucina	0,050
L-lisina HCl	0,040
L-metionina	0,015
L-fenilalanina	0,015
L-prolina	0,020
L-serina	0,030
L-treonina	0,020
L-triptófano	0,005
L-tirosina 2Na	0,02883
L-valina	0,020
Biotina	0,0002
D-ácido patoténico	0,00025
Cloruro de colina	0,003
Ácido fólico	0,001
Mio-inositol	0,035
Niacinamida	0,001
PABA	0,001
Piridoxina HCl	0,001
Riboflavina	0,0002
Tiamina HCl	0,001
Vitamina B ₁₂	0,000005
Nitrato de calcio H ₂ O	0,100
Cloruro de potasio	0,400
Sulfato de magnesio (anhidrido)	0,04884
Cloruro sódico	6,000
Fosfato sódico, dibásico (anhidrido)	0,800
D-glucosa ^a	2,000
Glutaciona, reducida	0,001
Fenol rojo, Na	0,0053

a. Nota: este medio contiene 0,2% de glucosa

Tabla 2. Componentes del medio RPMI 2% G

Componente	Concentration 1 x	Concentration 2 x
Agua destilada	900 mL	900 mL
RPMI 1640 (Tabla 1)	10,4 g	20,8 g
MOPS	34,53 g	69,06 g
Glucosa	18 g	36 g

Tabla 3. Solventes para la preparación de las soluciones stock, características e intervalo de concentraciones adecuado de los agentes antifúngicos para el test

Agente antifúngico	Solvente	Características	Rango del test (mg/L)
Anfotericina B	DMSO _a	Hidrofóbico	0,03 - 16
Fluconazol	DMSO/Agua _b	Hidrofílico/hidrofóbico	0,12 - 64
Itraconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8
Voriconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8
Posaconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8
Flucitosina	Agua	Hidrofílico	0,12 - 64
Caspofungina	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8
Micafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8
Anidulafungina	DMSO	Hidrofóbico	0,016 - 8

a DMSO Dimetilsulfóxido

b De acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sustancia pura distribuida por Pfizer era soluble en agua con facilidad. El polvo adquirido a Sigma-Aldrich, sin embargo, es altamente hidrófobo poco soluble en agua, por lo tanto debe disolverse en DMSO como recomienda el fabricante

(http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8929|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)

Tabla 4. Esquema para preparar diluciones seriadas de antifúngico con una concentración final de 0,12-64 mg/L

Paso	Concentration (mg/L)	Origen	Volumen de antifúngico (µL)	Volumen de solvente ^a (µL)	Concentración Intermedia (mg/L)	Concentración (mg/L) tras una dilución 1:100 con 2xRPMI 2%G ^b
1	12 800 ^c	Stock	200	0	12.800	128
2	12 800	Stock	100	100	6.400	64
3	12 800	Stock	50	150	3.200	32
4	12 800	Stock	50	350	1.600	16
5	1600	Paso 4	100	100	800	8
6	1600	Paso 4	50	150	400	4
7	1600	Paso 4	50	350	200	2
8	200	Paso 7	100	100	100	1
9	200	Paso 7	50	150	50	0,5
10	200	Paso 7	25	25	25	0,25

a. Consultar la Tabla 3 de los solventes necesarios para realizar las diluciones de los antifúngicos

b. La dilución 1:1 con la suspensión del inóculo da una concentración final que es la mitad que la indicada

c. Para diluciones seriadas con las concentraciones finales más altas de 16 mg/L y 8 mg/L comenzar con stocks de 3200 mg/L y 1600 mg/L respectivamente

Tabla 5. Preparación del estándar 0,5 de McFarland

Paso	Procedimiento
1	Añadir 0,5 mL de 0,048 mol/L BaCl ₂ (1,175% w/v BaCl ₂ ·2H ₂ O) a 99,5 mL de 0,18 mol/L (0,36 N) H ₂ SO ₄ (1% v/v) y mezclar vigorosamente
2	Medir la densidad empleando un espectrofotómetro con una trayectoria de 1 cm de luz y la cubeta correspondiente. La absorbancia a 530 nm debe estar entre 0,12 y 0,15
3	Distribuir en tubos de tapón de rosca del mismo tamaño que los usados para el ajuste del inóculo
4	Almacenar los estándares cerrados en oscuridad a temperatura ambiente
5	Mezclar el estándar en un vórtex antes de su uso
6	Renovar los estándares o chequear la absorbancia pasados tres meses de almacenaje

Tabla 6. Intervalos de CMI's aceptables de las cepas control (mg/L) para los distintos antifúngicos

Antifúngico	<i>Candida krusei</i> ATCC¹ 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida albicans</i> CL-CNM² F 8555	<i>Candida krusei</i> CL-CNM CL3403
Anfotericina B	0,12–1,0	0,12–1,0	0,06–0,5	0,25–1,0
Flucitosina	1,0–4,0	0,12–0,5	0,06–0,25	2,0–8,0
Fluconazol	16,0–64,0	0,5–2,0	32,0–128,0	16,0–64,0
Itraconazol	0,03–0,12	0,03–0,12	0,25–1,0	0,12–0,5
Voriconazol	0,03–0,25	0,015–0,06	0,5–2,0	0,12–0,5
Posaconazol	0,015–0,06	0,015–0,06	0,12–0,5	0,06–0,25
Caspofungina	ND	ND	ND	ND
Anidulafungina	≤0,06	0,25–1,0	ND	ND
Micafungina	ND	ND	ND	ND

1. ATCC: American Tissue Culture Collection

2. CL-CNM: Colección del Centro Nacional de Microbiología (España)

ND: no disponible