

EUCAST DOCUMENTO DEFINITIVO 9.1

Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para hongos filamentosos formadores de conidias

Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

J. L. Rodriguez-Tudela (Chairman)¹, M. C. Arendrup², S. Arikan³, F. Barchiesi⁴, J. Bille⁵, E. Chryssanthou⁶, M. Cuenca-Estrella¹, E. Dannaoui⁷, D. W. Denning⁸, J. P. Donnelly⁹, W. Fegeler¹⁰, C. Lass-Flörl¹¹, C. Moore⁸, M. Richardson¹², P. Gaustad¹³, A. Schmalreck¹⁴, A. Velegriaki¹⁵, P. Verweij⁹

¹Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain, ²Unit of Mycology and Parasitology, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, ³Hacettepe University Medical School, Dept. of Microbiology and Clinical Microbiology, Ankara Turkey, ⁴Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy, ⁵University Hospital, Lausanne, Switzerland, ⁶Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden, ⁷Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques, Unité de Mycologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France, ⁸Wythenshawe Hospital, Manchester UK, ⁹Radboud University Nijmegen Medical Centre & Nijmegen University Centre for Infectious Diseases, Radboud University Nijmegen, The Netherlands, ¹⁰Universitätsklinikum Münster, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Münster, Germany, ¹¹Division of Hygiene and Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria, ¹²University of Helsinki, Helsinki, Finland, ¹³Institute of Medical Microbiology, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway, ¹⁴Mikrobiologische Beratung & Service, München, Germany, ¹⁵Mycology Reference Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece.

Corresponding author: J. L. Rodriguez-Tudela, Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km.2, E-28220 Majadahonda, Spain. E-mail: jlrtudela@isciii.es

INTRODUCCION

Los test de sensibilidad a los antifúngicos se realizan en aquellos hongos causantes de enfermedad, especialmente si pertenecen a especies que presentan resistencia a los agentes antifúngicos más comúnmente usados. Estas pruebas son también importantes en la vigilancia de la resistencia, en estudios epidemiológicos y para comparar la actividad *in vitro* de nuevos agentes 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/o para confirmar la sensibilidad de organismos que dan resultados equívocos o poco fiables en las pruebas de rutina. En estos métodos de dilución se prueba la capacidad de los hongos de producir crecimiento visible en los pocillos de placas de microdilución con medio de cultivo, que contienen 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 puede ayudar en la toma de las decisiones terapéuticas correctas.

El creciente número de opciones para el tratamiento de la infección fúngica invasora junto con la resistencia documentada a los antifúngicos por parte de determinadas cepas y especies, confirma la necesidad de tener métodos estandarizados para la determinación *in vitro* de la sensibilidad de los aislados clínicos de hongos filamentosos a los nuevos antifúngicos así como a los que se vienen usando hasta ahora [1-9]. El método descrito en este documento está dirigido a los hongos filamentosos que causan infecciones fúngicas importantes desde el punto de vista clínico.

ALCANCE

El método estándar descrito aquí es un método válido para analizar la sensibilidad a los distintos antifúngicos de los hongos productores de conidias mediante la determinación de la CMI. Las CMIs indican la actividad de un antifúngico dado en las condiciones descritas y pueden usarse para el 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 filamentosos en “sensible” (S), “intermedio” (I), o “resistente” (R) a un determinado fármaco

antifúngico. Además, la distribución de las CMI puede usarse para definir poblaciones fúngicas *wildtype* o *non-wildtype*.

El método descrito en este documento pretende proporcionar un método válido, fácil, rápido y económico para probar la sensibilidad de los hongos filamentosos a los antifúngicos y facilitar un grado aceptable de correlación entre los resultados de los diferentes laboratorios. No obstante, hay muchos factores que influyen en la CMI de los hongos filamentosos de los antifúngicos como fue descrito por Rambali y col [10]. La CMI de itraconazol para *Aspergillus* está enormemente influenciada por la forma del pocillo de la placa de microdilución, por la temperatura y la duración del tiempo de incubación. Puesto que los factores técnicos que tienen que ver con el trabajo en el laboratorio son de suma importancia, este protocolo estandarizado se centra en las condiciones del ensayo, incluyendo la preparación del inóculo, el tamaño de dicho inóculo, el tiempo de incubación y la temperatura y la composición del medio.

TERMINOS Y DEFINICIONES

Antifúngico

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

Potencia

La potencia es la fracción activa antimicrobiana de una sustancia, 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 (Sistema Internacional) como mg/L. Aunque mg/L es equivalente a $\mu\text{g/mL}$, el uso de este último no se recomienda.

Solución stock o solución madre

La solución inicial que se emplea para realizar diluciones adicionales.

CMI

Es la menor concentración que inhibe el crecimiento de los hongos en un periodo definido de tiempo. La CMI se expresa en mg/L.

Puntos de corte

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

Sensible (S): Un hongo 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). Un hongo inhibido *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 clase intermedia implica que una infección causada por un aislado se puede tratar con eficacia en lugares del cuerpo donde el fármaco está concentrado fisiológicamente o cuando pueden emplearse altas dosis de antifúngico. Esta categoría también indica 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.

Tipo salvaje o silvestre

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

Cepa control

Una cepa de un hongo catalogada y caracterizada con sensibilidad estable y definida a los antifúngicos y también fenotipos y/o genotipos estables. 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 diluciones seriadas (usualmente dobles) del antifúngico se realizan 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.

Caldo

Un medio líquido empleado para el crecimiento *in vitro* de los hongos.

Inóculo

El número de conidias (unidades formadoras de colonias) en un volumen definido. El inóculo se expresa en unidades formadoras de colonias por mililitro (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 μ l de volumen por pocillo al cual se le añaden 100 μ l de inóculo.

Medio

Se recomienda RPMI-1640 (con glutamina y un indicador de pH sin bicarbonato) suplementado con glucosa en una concentración final de 2% (RPMI 2% G). El medio RPMI es tan adecuado como otros medios sintéticos [11,12]. Se ha demostrado que el uso de concentraciones más elevadas de glucosa permite un mejor crecimiento y facilita la determinación de los puntos finales [13]. 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. La composición del RPMI 1640 se describe en

la Tabla 1. El medio recomendado, RPMI con 2% de glucosa (RPMI 2%G), se prepara como sigue:

1. Añadir los componentes que aparecen en la Tabla 2 a 900 mL de agua destilada.
2. Agitar hasta que los componentes estén 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 de tamaño de poro.
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.

ANTIFUNGICOS

Todas las soluciones de antifúngicos deben prepararse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación. El polvo valorado de los antifúngicos 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, la potencia, la 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 se recomiende de otro modo por el fabricante. Lo ideal es que se repartan en alícuotas, cada una de las cuales se utilizará para un solo uso. 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 los antifúngicos deben prepararse teniendo en cuenta la potencia del lote del polvo valorado que se está usando. La cantidad de polvo y de diluyente o solvente necesario para preparar una solución estándar 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 valorado de antifúngico en una balanza de precisión que haya sido calibrada hasta dos decimales, cuando se pesan 100 mg. Se recomienda pesar al menos 100 mg de polvo valorado.

Preparar las soluciones stocks de fármacos concentradas 200 veces respecto a la concentración más alta que se va a probar. El proveedor debe proporcionar información sobre la solubilidad de los antifúngicos. Para disolver ciertos antifúngicos es necesario emplear otros solventes diferentes al agua (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 menos. A excepción de las equinocandinas, los antifúngicos pueden almacenarse a -70°C al menos durante seis meses sin pérdida significativa de actividad [14]. Las equinocandinas son inestables y la mejor opción es preparar las soluciones stock el mismo día que las placas de microdilución. Si esto no es posible, las soluciones stock se deben mantener a -70°C un máximo de dos meses.

Una vez sacados de -70°C y descongelados hay que usarlos en el mismo día. El deterioro significativo del antifúngico se verá reflejado en los resultados de los test de sensibilidad para las cepas del control de calidad. Si es necesario, se puede probar el antifúngico para determinar la potencia.

Preparación de las soluciones de trabajo

El intervalo de concentraciones dependerá del organismo y del antifúngico que se va a ensayar. Dicho rango debe abarcar el punto de corte, si éste existe, así como los resultados esperados para las cepas del control de calidad. Los intervalos de concentración de fármaco recomendados son los que aparecen en la Tabla 3. Diluciones seriadas al doble partiendo de 1mg/L se preparan 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. Este abordaje permite preparar el inóculo en agua destilada.

Las diluciones se deben preparar de acuerdo a las recomendaciones ISO [15]. Se pueden emplear esquemas alternativos de diluciones si se demuestra que se realizan tan bien como el método de referencia. 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 agente 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 dichos 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. 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 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 agente 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. 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. Las columnas 11 y 12 contendrán 100 µl de medio 2x RPMI 2% G.

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 menos durante un máximo de seis meses o a -20°C durante un mes como máximo, sin pérdida de potencia del fármaco. Una vez que las placas se han descongelado no deben volver a congelarse. Las equinocandinas son inestables, las placas no deben mantenerse a -70°C por un periodo superior a dos meses.

PREPARACION DEL INOCULO

La estandarización del inóculo es esencial para conseguir precisión y reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El inóculo final debe tener entre $1,5 \times 10^5$ UFC/mL y $2,5 \times 10^5$ UFC/ml.

Método de suspensión de las esporas

Subcultivar los aislados en Agar patata dextrosa en tubo inclinado, o en otro medio de cultivo en el que el hongo sea capaz de esporular con facilidad. Incubarlo a 35°C. Preparar las suspensiones de inóculo de cultivos frescos (2 a 5 días). Con algunas cepas será necesario un mayor tiempo de incubación para una correcta esporulación.

Recubrir las colonias con aproximadamente 5 ml de agua estéril suplementada con 0.1% de Tween 20. Raspar los conidios cuidadosamente con un hisopo estéril y transferirlos con una pipeta a un tubo estéril. Homogeneizar la suspensión durante 15 segundos con un vórtex a 2.000 rpm. Realizar las diluciones necesarias para conseguir la concentración adecuada para el contaje en una cámara de recuento. También hay que revisar en las preparaciones de inóculo la presencia de hifas o agregados. Si aparece un significativo número de hifas (>5% de estructuras fúngicas), transferir 5 ml de la suspensión a una jeringuilla estéril conectada a un filtro estéril con un tamaño de poro de 11µm de diámetro, filtrar y recoger en un tubo estéril. Este paso, que rara vez se necesita para *Aspergillus* spp., elimina las hifas y

se obtiene de este modo una suspensión compuesta de conidias. Si se detectan agregados el inóculo debe agitarse de nuevo en un vórtex durante otros 15 segundos. Repetir este paso tantas veces como sea necesario hasta que los agregados desaparezcan. Ajustar la suspensión con agua destilada estéril a una concentración de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL contando las conidias en una cámara de recuento. Después diluir la suspensión 1:10 con agua destilada estéril hasta obtener un inóculo de trabajo de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL [16-18].

Inoculación de las placas de microdilución

Las placas de microdilución deben inocularse en los 30 min posteriores a la estandarización del inóculo para mantener la concentración de esporas viables. Inocular cada pocillo de la placa con 100 μ l de la suspensión de conidios de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL. De este modo se obtendrá la concentración requerida de fármaco así como la densidad del inóculo (1×10^5 - $2,5 \times 10^5$ UFC/ml). Hay que inocular también los pocillos correspondientes al control de crecimiento (columna 11) que contienen 100 μ l de medio estéril libre de fármaco con 100 μ l de la misma suspensión de inóculo. Rellenar la columna 12 de la placa de microdilución con 100 μ l de agua destilada estéril del lote empleado para preparar el inóculo como un control del medio y del agua destilada (sólo medio sin fármaco). Ensayar organismos de control de calidad usando el mismo método cada vez que se pruebe un nuevo aislado. Deben realizarse recuentos para asegurarse de que los pocillos del ensayo contienen entre 1×10^5 y $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Esto puede realizarse tomando 20 μ l del pocillo del control de crecimiento inmediatamente después de la inoculación y diluirlo en 2 mL de agua destilada estéril suplementada con 0,1% de Tween 20. Homogeneizar la suspensión en un vórtex giratorio a 2,000 rpm. Después sembrar 100 μ l de esta suspensión en una placa de agar adecuada la cual se incuba durante 24-48 h, o hasta que las colonias se puedan contar. Deben contarse de 50 a 250 colonias. Se obtienen resultados similares sembrando 50 μ l ó 25 μ l de la suspensión pero en ese caso el número de colonias es proporcionalmente más bajo y el recuento es más sencillo. Si no se consigue el inóculo correcto, no pueden usarse los resultados para esa cepa.

Incubación de las placas de microdilución

Incubar las placas de microdilución sin agitación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en aire ambiente durante 24-48 h. En muy pocos casos será necesario prolongar durante otras 24 horas para obtener un crecimiento adecuado en los pocillos de control. No se recomiendan

incubaciones más largas. Los hongos mucorales deben leerse a las 24 h. Otros hongos deben leerse a las 48 h.

Lectura de los resultados

Los puntos finales se leen visualmente, mediante registros del grado de crecimiento para cada pocillo empleando un espejo de aumento

CMI. Puntos finales para todos los fármacos excepto las equinocandinas

La concentración de fármaco que produce ausencia de crecimiento es el valor de la CMI. Ignorar colonias únicas en la superficie y pocillos salteados.

Concentración Mínima Efectiva (CME). Puntos finales para las equinocandinas

Es la concentración de fármaco más baja que produce cambios macroscópicos del crecimiento filamentosos respecto al observado en los pocillos de control positivo. Se observan microcolonias o crecimiento granular (que debe ignorarse). El personal sin experiencia puede realizar CMEs microscópicas examinando al microscopio un pequeño volumen del primer pocillo que presenta microcolonias redondas (CME visual). La CME es la menor concentración de equinocandina en la que se observan grupos de hifas anormales, cortas y ramificadas en contraste a las largas y no ramificadas que se observan en el pocillo de control

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La interpretación de las CMIs es un reto y los puntos de corte están aún por determinar. La relevancia clínica de estos ensayos en hongos filamentosos también es incierta. La mayoría de la información procede de la experiencia con las especies de *Aspergillus* que causan aspergilosis invasora y se puede resumir como sigue:

Anfotericina B

No hay datos disponibles que indiquen una clara correlación entre las CMIs y el resultado del tratamiento [10,19, 20]. La información más útil, con frecuencia, es la derivada de la completa identificación del hongo. La experiencia hasta la fecha indica que las CMIs para anfotericina B en la mayoría de los *Aspergillus* spp. se agrupan

entre 0,5 y 2mg/L. Sin embargo, los aislados de *A. terreus* pueden presentar CMI más altas para anfotericina B [5,21] y, en general, las infecciones por *A. terreus* se asocian con una respuesta reducida a anfotericina B comparada con los pacientes con infecciones causadas por las especies más comunes de *Aspergillus* [5]. Por tanto, las CMIs elevadas a anfotericina B deben tenerse en cuenta y hay que considerar alternativas a este antifúngico en enfermedad fúngica invasora causada por *A. terreus*.

Itraconazol

Se tienen más datos acerca de la detección de resistencia a azoles que respecto a la relación entre las CMIs y el resultado al tratamiento [3,9]. Se aislaron dos cepas de pacientes que no respondieron a itraconazol. Esas cepas fueron resistentes en un modelo de aspergilosis invasora en ratón y presentaron CMIs elevadas a itraconazol (CMI \geq 8mg/L) [3]. Además, varios estudios han demostrado que las mutaciones en el gen *cyp51A* se asocian con altas CMIs para itraconazol [4,6-8].

Voriconazol

No hay datos disponibles que indiquen una correlación entre la CMI y el resultado del tratamiento. Sin embargo, algunos aislados con CMIs elevadas para itraconazol y mutaciones en el gen *cyp51A* presentaron también elevadas CMIs de voriconazol. Por tanto, la resistencia cruzada no se puede descartar y debe tenerse en consideración.

Posaconazol

No hay datos disponibles que indiquen una correlación entre la CMI y el resultado del tratamiento. Sin embargo, al igual que con el voriconazol, los aislados con CMIs elevadas de itraconazol y mutaciones en el gen *cyp51A* pueden presentar también elevadas CMIs de posaconazol. La resistencia cruzada debe considerarse [4,6-8].

Caspofungina

No hay datos que indiquen una correlación entre la CMI o la CME y el resultado del tratamiento.

Micafungina

No hay datos que indiquen una correlación entre la CMI o la CME y el resultado del tratamiento.

CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control son los medios por los que se asegura la calidad de los resultados y el CLSI [22] 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 intervalo de las concentraciones probadas y el patrón de sensibilidad a los antifúngicos debe ser estable. Las cepas de control recomendadas aparecen en la Tabla 5 y se seleccionaron de acuerdo a dichos criterios [22]. 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

Los aislados de hongos pueden guardarse liofilizados o congelados a -70°C o menos [23, 24]]. 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.

Uso de las cepas de 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 CMI's deben estar en los intervalos control que aparecen en la Tabla 5. Si más de una de cada 20 pruebas 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 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 5) para asegurar que las CMI's están en el rango esperado.

REFERENCIAS

1. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, *et al.* Invasive aspergillosis - Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine* 2000; **79**: 250-260.
2. Verweij PE, van den Bergh MFQ, Rath PM, de Pauw BE, Voss A, Meis JFGM. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: Case report and review. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1606-1609.
3. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, *et al.* Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1364-1368.
4. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1120-1124.
5. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, *et al.* Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *British J Haematol* 2005; **131**: 201-207. EUCAST E.DEF 9.1 July 2008 Antifungal MIC method for conidia forming moulds Page 11 of 13
6. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2747-2750.
7. Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Targeted gene disruption of the 14 α -sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2536-2538.
8. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, *et al.* A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1897-1904.

9. Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infection* 2000; **41**: 203-220.
10. Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, *et al.* Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**:163-177.
11. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, *et al.* Multicenter Evaluation of A Broth Macrodilution Antifungal Susceptibility Test for Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 39-45.
12. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, *et al.* Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 1648-1654.
13. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; **40**: 401-414.
14. Anhalt JP, Washington II JA. Preparation and storage of antimicrobials. In: *et al.* BAe, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 1199-1200.
15. ISO. 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. ISO 20776-1, 1-20. 15-11-2006. Geneva, Switzerland, ISO.
16. Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Petrikkou 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.
17. Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 1345-1347.
18. Rodriguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5236-5237.
19. Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, *et al.* Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**: 85-93.
20. Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, *et al.* Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 282-288.
21. Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro activities of three licensed Antifungal agents against Spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3085-3088.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. 2002. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002.
23. Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 1000-1004.
24. Chandler D. Cryopreservation of Fungal Spores Using Porous Beads. *Mycological Research* 1994; **98**: 525-526.

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	Concentración 1 x	Concentración 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	Hidrofóbico	0,0312 - 16
Itraconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,0156 - 8
Voriconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,0156 - 8
Posaconazol	DMSO	Hidrofóbico	0,0156 - 8
Caspofungina	Agua	Hidrofílico	0,0312 - 8
Micafungina	Agua	Hidrofílico	0,0312 - 16

DMSO, dimetil sulfóxido

Tabla 4. Esquema para la preparación de las diluciones seriadas con una concentración final de 0,0312-16 mg/L

Paso	Concentración (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	3.200 ^c	Stock	200	0	3.200	32
2	3.200	Stock	100	100	1.600	16
3	3.200	Stock	50	150	800	8
4	3.200	Stock	50	350	400	4
5	400	Paso 4	100	100	200	2
6	400	Paso 4	50	150	100	1
7	400	Paso 4	50	350	50	0,5
8	50	Paso 7	100	100	25	0,25
9	50	Paso 7	50	150	12,5	0,125
10	50	Paso 7	25	175	6,25	0,625

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 8 mg/L comenzar con una concentración stock de 1600mg/L

Tabla 5. Intervalos de CMI aceptables (mg/L) para las cepas del control de calidad

Antifungal Agent	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	<i>Aspergillus fumigatus</i> F 6919	<i>Aspergillus flavus</i> CM 1813
Anfotericina B	0,25-1	0,5-2,0	0,25-1,0	1,0-4,0
Itraconazol	0,12-0,5	0,12-0,5	8,0-16,0	0,12-0,5
Voriconazol	0,25-1,0	0,5-2,0	0,5-2,0	0,5-2,0
Posaconazol	0,03-0,25	0,12-0,5	0,5-2,0	0,12-0,5
Caspofungina	ND	ND	ND	ND
Micafungina	ND	ND	ND	ND

ND No disponible