

Mesa redonda 1
Valoración *in vitro* de los antifúngicos.
Logros y problemas pendientes

Ponencia

Estado de las pruebas de sensibilidad *in vitro* para levaduras y hongos filamentosos. Esquemas del NCCLS y el EUCAST. Interpretación de los resultados

E. Cantón Lacasa

Servicio de Microbiología, Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Las infecciones sistémicas profundas producidas por levaduras u hongos filamentosos eran muy escasas antes de la década de 1980. La amfotericina B era el único antifúngico disponible para su tratamiento hasta el año 1990, fecha en que se comercializaron fluconazol e itraconazol, por lo que las pruebas de sensibilidad no eran necesarias. La utilización de nuevas tecnologías, tanto diagnósticas como de tratamiento (quimioterapia, radioterapia, dispositivos intravasculares, trasplante de órganos, etc.) ha producido un aumento de la población susceptible de adquirir una infección fúngica, así como cambios en la epidemiología de estas infecciones. Con el aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas y el desarrollo paralelo de cepas resistentes, el laboratorio de microbiología ha adquirido un papel relevante en la selección del antifúngico más adecuado. Todo ello, junto con la introducción de nuevos grupos antifúngicos o de nuevas formulaciones de los ya existentes, hace necesario la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) es un organismo estadounidense dedicado a la estandarización de las pruebas de laboratorio. En 1992 publicó el primer documento, M27-P, en el cual se daban las normas para la realización de las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos, utilizando el método de macrodilución. Tres años después salió a la luz el documento M27-T, en el cual se estandarizó el método de microdilución, y finalmente en 1997 publicó el método definitivo, M27-A, que incluye los límites de las CMI para las cepas control de calidad y los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Para los hongos filamentosos, el primer intento de estandarización se publicó en 1998 (documento M38-P), y en 2002 se publicó el documento definitivo, M38-A. Aunque son metodologías estandarizadas, todavía presentan ciertas limitaciones.

Limitaciones del método M27-A

- Ha sido estandarizado para determinar la sensibilidad de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*; no obstante, puede aplicarse a otras levaduras, con la excepción de *Malassezia furfur* debido al requerimiento de aceite para su crecimiento.
- Los puntos de corte son aplicables únicamente a los antifúngicos sistémicos.
- La lectura de los resultados es subjetiva y requiere personal entrenado.
- *C. neoformans* no crece bien en el medio de cultivo recomendado.
- No hay puntos de corte para amfotericina B.
- No detecta las cepas resistentes a amfotericina B.
- No está estandarizado para nuevos grupos de antifúngicos (equinocandinas, sordarinas, etc.).

Limitaciones del método M38-A

- Estandarizado sólo para hongos formadores de conidias.
- No hay puntos de corte definidos.
- No hay cepas control de calidad.
- La DO del inóculo y el tiempo de incubación dependen de la especie.
- No está estandarizado para nuevos grupos de antifúngicos (equinocandinas, sordarinas, etc.).

El *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) ha propuesto a su vez un documento alternativo al del NCCLS basado en ciertas modificaciones del método M27-A (suplementación del medio con glucosa, inóculo más elevado y lectura espectrofotométrica a las 24 h). Se comentarán las ventajas e inconvenientes de cada método.

Sistemas automatizados en la valoración de los antifúngicos

J. Gil, R. Benito, I. Ramírez de Ocariz y M.C. Rubio

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza

El incremento de las infecciones fúngicas, el desarrollo de nuevos antifúngicos o de nuevas formulaciones de los ya establecidos, la aparición de cepas resistentes, el uso de pautas profilácticas, de tratamientos de mantenimiento y de combinaciones sinérgicas, ha creado la necesidad creciente de conocer la eficacia de los antifúngicos. Esto ha obligado al desarrollo de métodos reproducibles de evaluación *in vitro* que sirvan de guía en la instauración del tratamiento. Con el fin de caminar hacia la estandarización, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), a principio de los 80, formó un Subcomité con el objeto de establecer una normativa para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras para posteriormente realizar lo mismo con los hongos filamentosos. El primer resultado de este proceso para las levaduras fue el documento M27-P publicado en 1992 y al que le siguieron otros hasta llegar al M27-A2 en 2002. El interés del Subcomité hacia la estandarización de un método para el estudio de sensibilidad frente a los hongos filamentosos se vio culminado en 1998 con el documento M38-P y con el M38-A en 2002.

A pesar del avance que ha supuesto la existencia de estos documentos se trata de métodos no exentos de dificultades y que, debido a su laboriosidad, no pueden realizarse de rutina en un laboratorio de microbiología clínica. Es por ello que surgen trabajos evaluando métodos alternativos al NCCLS que sean fiables y que simplifiquen las pruebas de sensibilidad. Estos nuevos métodos pueden agruparse en aquellos basados en caldo (microdilución sin o con la adición de un indicador redox como Alamar Blue, MTT o XTT, o de compuestos fluorescentes como el CEDA, los basados en el consumo de glucosa como el SRA, etc.) y en agar (difusión como Etest y disco-placa, o de dilución). De este modo, la aparición de métodos automatizados de ejecución rápida y sencilla supone su aceptación y utilización en los laboratorios de microbiología clínica.

Entre los métodos de microdilución cabe destacar los colorimétricos. Son métodos basados en el documento M27-A2 que incorporan un indicador de oxido reducción (Alamar Blue) en el medio de cultivo que cambia de color ante la presencia de crecimiento, facilitando la lectura visual. La lectura se realiza por cambio de color lo que da lugar a mayor objetividad, sin olvidar que sigue existiendo el problema del efecto de arrastre, dándose en este caso un cambio de azul a púrpura en vez de a rosa. Entre ellos está:

-Fungitest®: Método simplificado que incluye anfotericina B (ANB), 5-fluorocitosina (5FC), miconazol, ketoconazol (KZ), itraconazol (IZ) y fluconazol (FZ) a dos concentraciones críticas, lo que no permite una valoración cuantitativa. Las concentraciones de ANB (2 y 8 mcg/ml) e IZ (0.5 y 4 mcg/ml) son altas. La correlación global con el método de referencia oscila entre el 76% y el 100% en dependencia del binomio germen-antifúngico.

-Sensititre YeastOne®: Incluye como antifúngicos ANB, FZ, IZ, KZ, 5FC y voriconazol (VZ), todos ellos a concentraciones dobles seriadas con rangos similares a los del documento M27-A2. Con buena reproducibilidad, es útil para el estudio de sensibilidad de las levaduras con una concordancia con el documento M27-A2 del 83% al 100% en dependencia de las series, del germen y del antifúngico. La correlación con el NCCLS, para *Aspergillus* spp. es del 90% para itraconazol y del 97% para anfotericina y para los dermatofitos varía del 67% para fluconazol al 88% para itraconazol e incluso 100% en dependencia del binomio dermatofito/antifúngico. Debido a lo no existencia de un método de referencia para los dermatofitos su utilidad debe ser probada.

-ASTY colorimetric panel®: Incluye como antifúngicos ANB, 5FC, FZ e IZ a unas concentraciones similares a las del NCCLS. Su reproducibilidad es buena, y el grado de correlación global con el método de referencia es >90%,

oscilando del 83 al 100% en dependencia de la relación agente-antifúngico.

En diferentes fases de desarrollo cabe destacar métodos automatizados como: PASCO (Becton-Dickinson) con ANB, 5FC, KZ, IZ, FZ, terconazol, miconazol y clotrimazol, muestra una concordancia con el método M27-A2 $\geq 80\%$ para todos antifúngicos, excepto para terconazol (77%), miconazol (66%) y clotrimazol (53%). Trek microdilution panel (Trek Diagnostic Systems) que contiene ANB, 5FC, FZ, IZ, VZ, posaconazol y ravuconazol. La concordancia global con el documento M27-A2 comprende del 96% para ravuconazol al 100% para ANB. WiderYst panel (Soria Melguizo) que incluye ANB, 5FC, FZ, KZ, IZ y VZ.

Otros métodos basados en la dilución en caldo y comercializados son ATB-Fungus, Candifast, Mycostandard, Mycototal, Fungifast e Integral System Yeasts. La mayoría de ellos incluyen una o dos concentraciones de los diferentes antifúngicos.

Dentro de los métodos alternativos de difusión en agar se encuentran:

-El Etest®: Son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. La CIM se determina en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest. Su correlación global con el documento M27-A varía del 66 al 100% y con el método M38-A del 60 al 100% para *Aspergillus* spp. y otros filamentosos, variaciones todas ellas dependientes de una serie de variables como el binomio antifúngico-especie. Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B usando RPMI-1640 con glucosa al 2% o antibiótico medio nº 3. Con buena reproducibilidad, es una alternativa al NCCLS útil para el estudio de la actividad de los antifúngicos clásicos, los nuevos triazoles y caspofungina frente a las levaduras y muy útil para *Aspergillus* spp. y otros filamentosos al dar lugar a elipses de inhibición nítidas más fáciles de interpretar y al permitir detectar la resistencia a los nuevos triazoles y caspofungina, aunque es necesario realizar evaluaciones *in vitro-in vivo*.

-Difusión en disco: Método cualitativo que estudia la sensibilidad de las levaduras y filamentosos a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión radial del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Diversos autores han probado diferentes medios como RPMI-1640 con y sin adición de glucosa, medio de alta resolución, YNB agar y Müller-Hinton agar con glucosa al 2% y azul de metileno 0.5 mcg/ml (MHGA). En general la correlación con el NCCLS es buena y mucho mejor cuando se establecen las categorías sensible y sensibilidad disminuida (sensible dependiendo de la dosis y resistente) que cuando se diferencia sensible, sensible dependiendo de la dosis y resistente, al no clasificar bien las cepas resistentes de las sensibles dependiendo de la dosis para las que hay que hacer estudios cuantitativos. En MHGA se obtienen halos de inhibición mucho más claros que con los otros medios permitiendo una lectura más objetiva. Se trata de un método sencillo y útil para detectar los aislamientos de *Candida* spp. sensibles, debiendo de realizar CMI para aquellos resistentes. Entre otros, se encuentran disponibles discos de fluconazol y voriconazol.

-Un gran número de antifúngicos, tanto de uso tópico como sistémico, están comercializados a concentraciones estandarizadas en forma de tabletas: Neo-sensitabs®. La correlación con el documento M27-A2 es muy variable dependiendo del antifúngico y del medio utilizado.

Basados en la dilución en agar se encuentra CHROMAGAR Candida más fluconazol®. El medio de CHROMAgar lleva incorporado fluconazol a una concentración de 8 mcg/ml. Con una concordancia global con la microdilución en torno al 70%, permite la detección del 100% de las cepas no sensibles de *Candida krusei* y *Candida glabrata*. No obstante son necesarios más estudios para valorar la eficacia de este medio.

Utilidad del *E-test*[®] para estudio de sinergismo antifúngico

J. Pemán García y E. Cantón Lacasa

*Servicio de Microbiología, Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación,
Hospital Universitario La Fe, Valencia*

El tratamiento de las micosis profundas resulta complejo sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos debido, entre otras causas, al escaso número de antifúngicos sistémicos, a los efectos adversos graves de algunos de ellos y a la aparición de resistencias. La asociación de antifúngicos se está utilizando con más frecuencia con el fin de paliar en parte estos problemas y conseguir ciertos efectos beneficiosos: ampliar el espectro de acción, reducir la dosis de los antifúngicos, acortar el tiempo de tratamiento, evitar la aparición de resistencias o potenciar la acción de los fármacos (sinergismo). En algunos casos, la asociación de antifúngicos es contraproducente, desde el punto de vista microbiológico, ya que se puede anular o disminuir su acción (antagonismo) dependiendo de los antifúngicos combinados. Hasta la fecha, la literatura muestra resultados contradictorios para las mismas asociaciones de antifúngicos, por lo que es necesario disponer de un método estandarizado para medir la interacción con el fin de poder comparar los resultados entre los distintos laboratorios y ayudar al clínico en la elección de la mejor combinación posible. Para evaluar la actividad de los antifúngicos se dispone de métodos estandarizados: el M27-A2 (levaduras) y el M38-A (hongos filamentosos); sin embargo, no se dispone de un método estándar para el estudio de la acción combinada de los antifúngicos. Los métodos que se están aplicando para realizar estos estudios son el del tablero de ajedrez, que aplica la misma tecnología y parámetros que para la determinación de la CMI, y el de las curvas de letalidad. Ambos métodos son largos y difíciles de realizar, requieren personal especializado y mucho material. El *E-test*[®] es una técnica comercializada para determinar la sensibilidad a los antifúngicos, tanto en levaduras como en hongos filamentosos, que ha mostrado buena correlación con los métodos estandarizados M27-A2 y M38-A, es más fácil de realizar y requiere menos tiempo. Por otro lado, se ha documentado que es el mejor método para determinar la sensibilidad a la amfotericina B de las levaduras del género *Candida*, y es capaz de detectar la resistencia a itraconazol y amfotericina B en los hongos filamentosos. El propósito de esta ponencia es estudiar la utilidad del *E-test*[®] para evaluar la actividad de la combinación de antifúngicos. Además, se expondrán las condiciones de ensayo, interpretación de los resultados, su correlación con las curvas de letalidad y el método del tablero de ajedrez, así como las ventajas y limitaciones de las distintas técnicas utilizadas para la evaluación de la actividad conjunta de los antifúngicos.