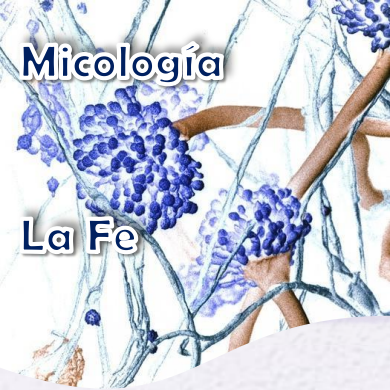


Técnicas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos

Javier Pemán

Unidad de Micología
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario La Fe
Valencia

Palma de Mallorca, 11 febrero 2010

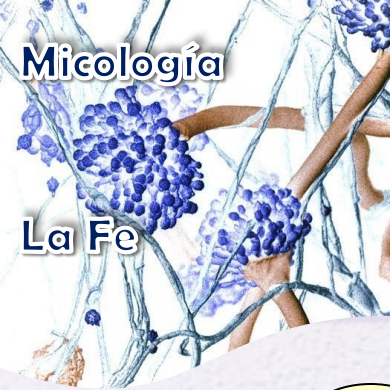


Micología

La Fe

Detección de resistencias *in vitro*

- ¿Son un problema real?
- La teoría (técnicas estandarizadas)
- La práctica (técnicas para la vida diaria)



Caso de la terapia antifúngica



Hongo:

- Resistencia AF
- Celula fúngica
- Tamaño población

Huésped:

- Estado inmune
- Persistencia del foco:
 - Cuerpos extraños
 - Abscesos
- Lugar de la infección
- Incumplimiento tto.

Antifúngico:

- Dosis
- Farmacocinética
- Actividad
- Interacciones





Puntos de corte

Oficial

| | CMI ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|----------------|--------------------------|----------|------------|
| | Sensible | SDD / I | Resistente |
| Fluconazol | ≤ 8 | 16-32 | ≥ 64 |
| Itraconazol | $\leq 0,125$ | 0,25-0,5 | ≥ 1 |
| 5-FC | ≤ 4 | 8-16 | ≥ 32 |
| Voriconazol | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| Caspofungina | ≤ 2 | | $>2^*$ |
| Anidulafungina | ≤ 2 | | $>2^*$ |
| Micafungina | ≤ 2 | | $>2^*$ |

* No sensible

- **CLSI M27-S3, 2008 (*Candida* spp.)**

Anfotericina B ≤ 1 ≥ 2

Oficioso

Patrón habitual de sensibilidad

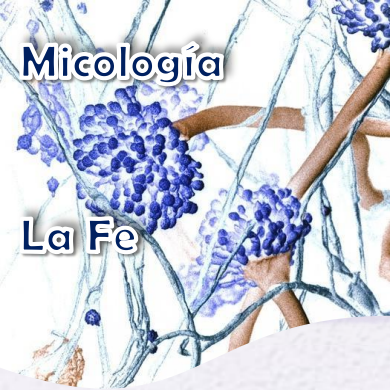
Levaduras

| | AMB | 5-FC | FZ | ITR | VOR | CAS |
|-------|-----|------|-------|-------|-----|-----|
| C alb | S | S | S | S | S | S |
| C tro | S | S | S/↓ | S/↓ | S | S |
| C par | S | S | S | S | S | S-R |
| C gla | I | S | SDD-R | SDD | S | S |
| C kru | I-R | I-R | R | SDD-R | S | S |
| C lus | S | R | S | SDD | S | S |

Patrón habitual de sensibilidad

Hongos filamentosos

| | AMB | ITR | VOR | POS | CAS |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| A fum | S | S | S | S | S |
| A terr | R | S | S | S | S |
| F sol | R | R | S | S | R |
| S api | R | R | S | S | S |
| S pro | R | R | R | R | R |
| Zygom | S | R | R | S | R |



Predicción respuesta clínica

- CMI

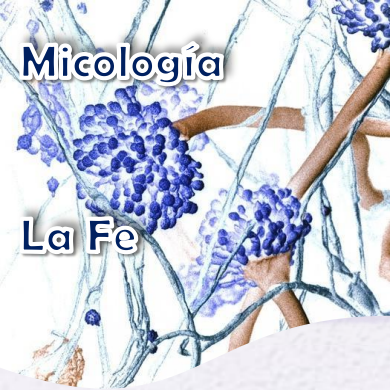


- Otros factores:

- Inmunidad
- Estado general
- Localización infección
- Cuerpos extraños

CMI ↑ : fracaso terapéutico

CMI ↓ : no éxito terapéutico



Estudio Sensibilidad AF

Métodos estandarizados

- **CLSI:**

- **Levaduras:**

- Dilución: M27-A3 (2008)
- Difusión: M44-A2 (2009)

- **Filamentosos:**

- Dilución: M38-A2 (2008)
- Difusión: M51-P (2009)

- **Dermatofitos:**

- M38-A2 (2008)

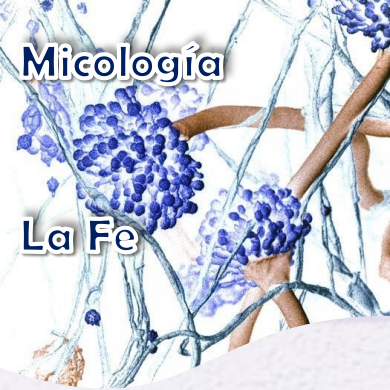
- **EUCAST:**

- **Levaduras:**

- Edef 7.1 (2008)

- **Filamentosos:**

- Edef 9.1 (2008)



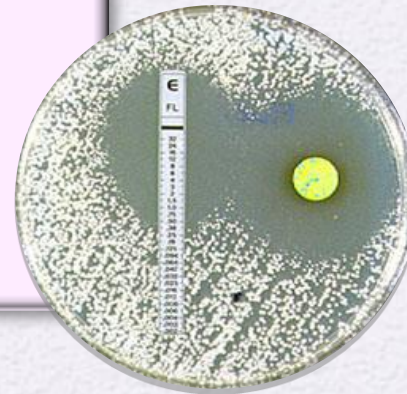
Micología

La Fe

Estudio Sensibilidad AF

Métodos comerciales disponibles

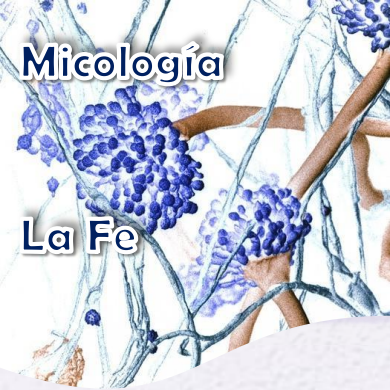
- **Dilución:**
 - Sensititre YeastOne
 - Fungitest
- **Difusión agar:**
 - Etest
 - Neo-Sensitab



Métodos estandarizados

diferencias

| | M27-A3 (CLSI) | EDef 7.1 (EUCAST) |
|-------------------------|--|---|
| Microplacas | Fondo en U | Fondo plano |
| Medio de cultivo | RPMI1640 con glutamina sin CO ₃ HNa y con 0,2% glucosa | RPMI1640 con glutamina sin CO ₃ HNa y con 2% glucosa |
| Tampón | MOPS 0,164M; pH 7±0,1 | |
| Inóculo | 0,5 a 2,5 ×10 ³ UFC/mL | 0,5 a 2,5 ×10 ⁵ UFC/mL |
| Incubación | <i>Candida</i> spp: azoles y anfotericina B, 24 - 48 h; candidinas, 24h. <i>C. neoformans</i> : 72h | <i>Candida</i> spp.: 24 h |
| Temperatura | 35 °C | |
| Lectura | Visual | Espectrofotométrica |
| Definición CMI | Anfotericina B: concentración más baja que produce una inhibición total del crecimiento. Resto: concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento ≥50% | |
| Cepas Control | <i>C. krusei</i> ATCC 6258; <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | |



CLSI, M27-A3

• Problemas:

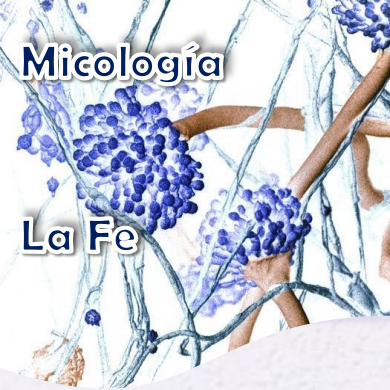
Lectura de anfotericina B

• Solución:

Utilizar Etest
o
Calcular la CMF



C. albicans
ATCC 200955



M44-A2

- **Medio:**

- Mueller-Hinton Agar (2% glucosa) + 0,5% Azul Metileno

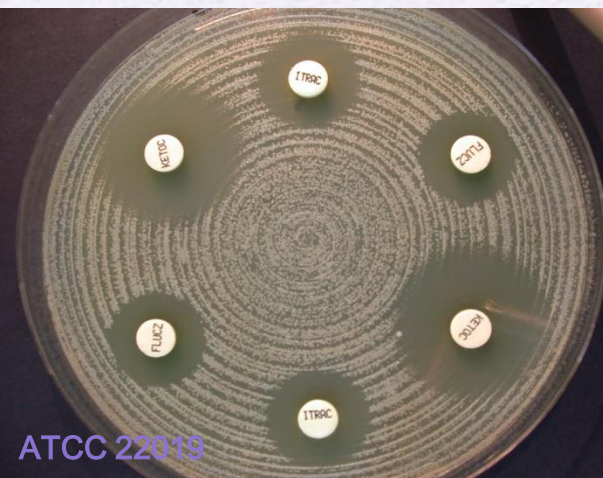
- **Inóculo:**

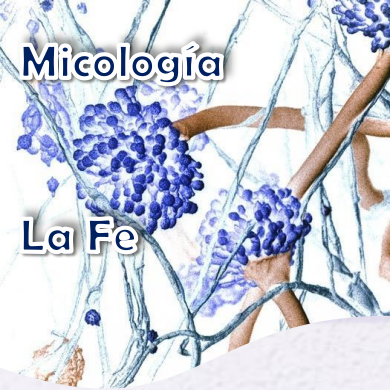
- $1-5 \times 10^6$ UFC/mL

- **Incubación (35 °C):**

- 20-24 h

- **Buena correlación con M27-A3**





M44-A2

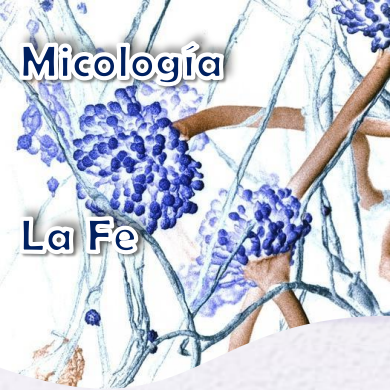
■ Solo estandarizado para CAS, FLZ y VOR:

– Puntos de corte (mm):



| | S | S-DD | R |
|-----|-----------|-------|-----------|
| FLZ | ≥ 19 | 15-18 | ≤ 14 |
| VOR | ≥ 17 | 14-16 | ≤ 13 |
| CAS | ≥ 11 | | |

También hay buena correlación con otros AF

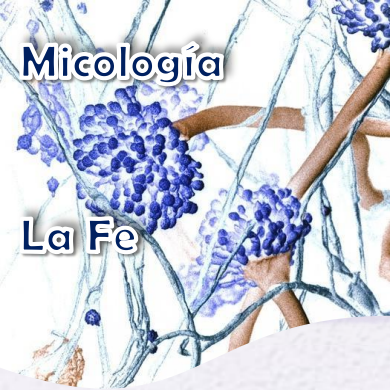


M44-A2

- **Problemas :**



- Sólo estandarizado para CAS, FLZ y VOR
- Lectura azoles
- *C. krusei* y *C. glabrata*
- CMI vs diámetro inhibición

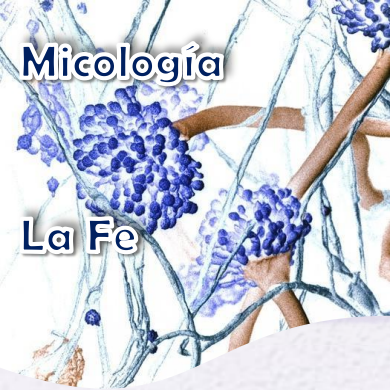


M44-A2

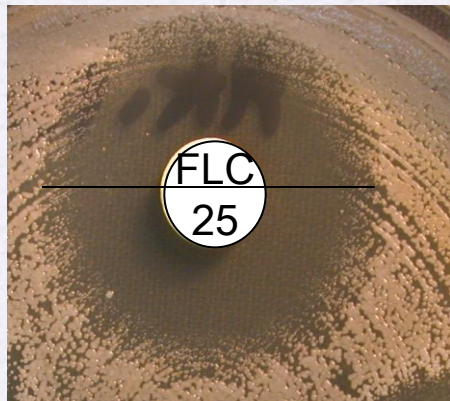


- *C. krusei* y *C. glabrata* :
 - A las 24 h no detecta bien las resistencias

Prolongar tiempo
incubación (48h)



M44-A2



- **Lectura de los azoles:**
 - Presencia de colonias en el interior del halo

Ignorar las microcolonias dentro del halo inhibición





Sensititre Yeast One Y09[®]

- **Medio:**

- RPMI (MOPS) + 1,5% glucosa, pH $7 \pm 0,1$
- Indicador colorimétrico (Alamar Blue)

- **Inóculo:**

- $1,5 - 8 \times 10^3$ UFC/mL

- **Incubación (35 °C):**

- 24 h

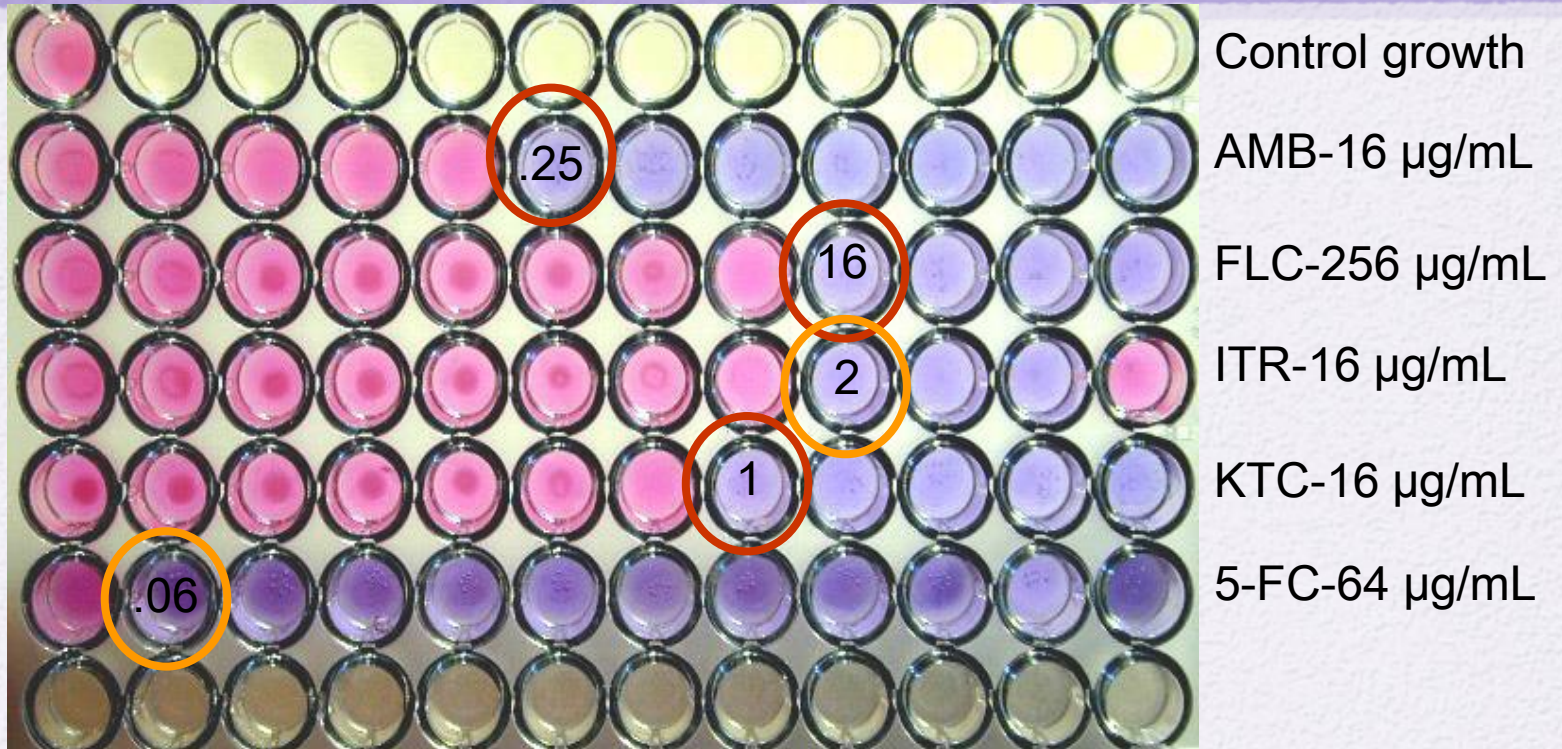
- **Lectura:**

- Cambio color (rosa → azul)
- NO por turbidez

- Anfotericina B
- 5-fluorocitosina
- Fluconazol
- Itraconazol
- Posaconazol
- Voriconazol
- Anidulafungina
- Caspofungina
- Micafungina

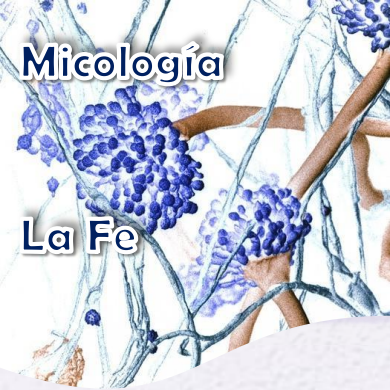
Lectura

Sensititre Yeast One[®]



CMI de anfotericina B: El pocillo azul con la concentración más baja de antifúngico

CMI de azoles: El pocillo azul o púrpura con la concentración más baja de antifúngico

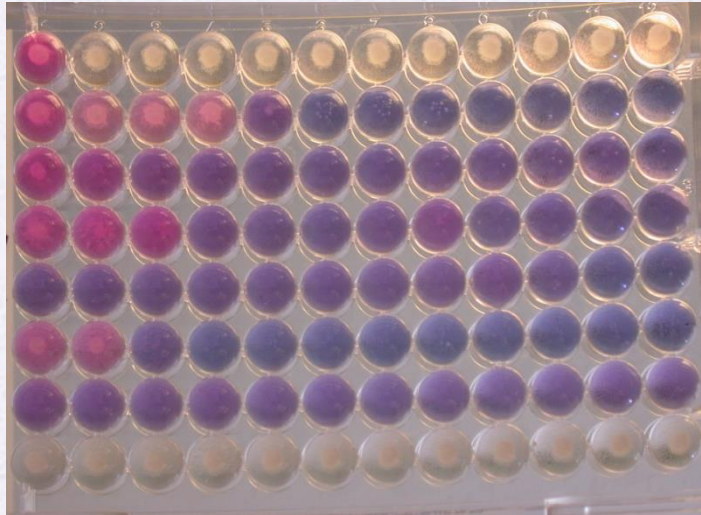


Micología

La Fe

Sensititre Yeast One[®]

- **Problemas:**
 - “Trailing”
 - Efecto paradójico



Sensititre Yeast One[®]



- **Presencia de “trailing”:**
 - Dificultad de apreciar el cambio de color en algunas cepas
 - En azoles

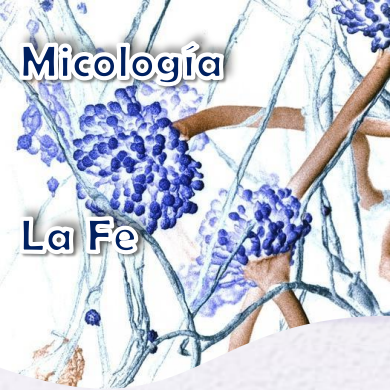
- No prolongar la incubación (18-24 h)
- Incubar a 35°C (muy importante con ITR)



Sensititre Yeast One[®]

- **Efecto paradójico:**
 - **Crecimiento a concentraciones > CMI**
 - **Más frecuente con ITR y candinas**

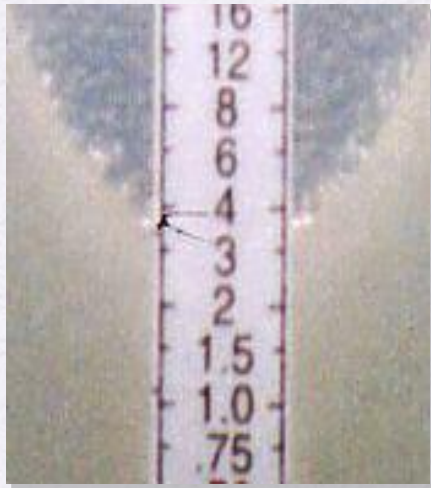
**No valorar su
aparición al
informar la CMI**



E TEST

Levaduras Hongos filamentosos

- **Medio:**
 - RPMI (MOPS) + agar 2% glucosa, pH $7 \pm 0,1$
- **Inóculo:**
 - 0,5 McFarland ($1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL)
- **Incubación (35 °C):**
 - 24 – 48 h (*Candida* spp)
 - 48 – 72 h (*Cryptococcus neoformans*)
 - 18 – 48 h (H filamentosos)
- **Lectura:**
 - AMB: CMI intersección del halo con la tira de Etest
 - Azoles: CMI inhibición aparente del crecimiento (~80%)



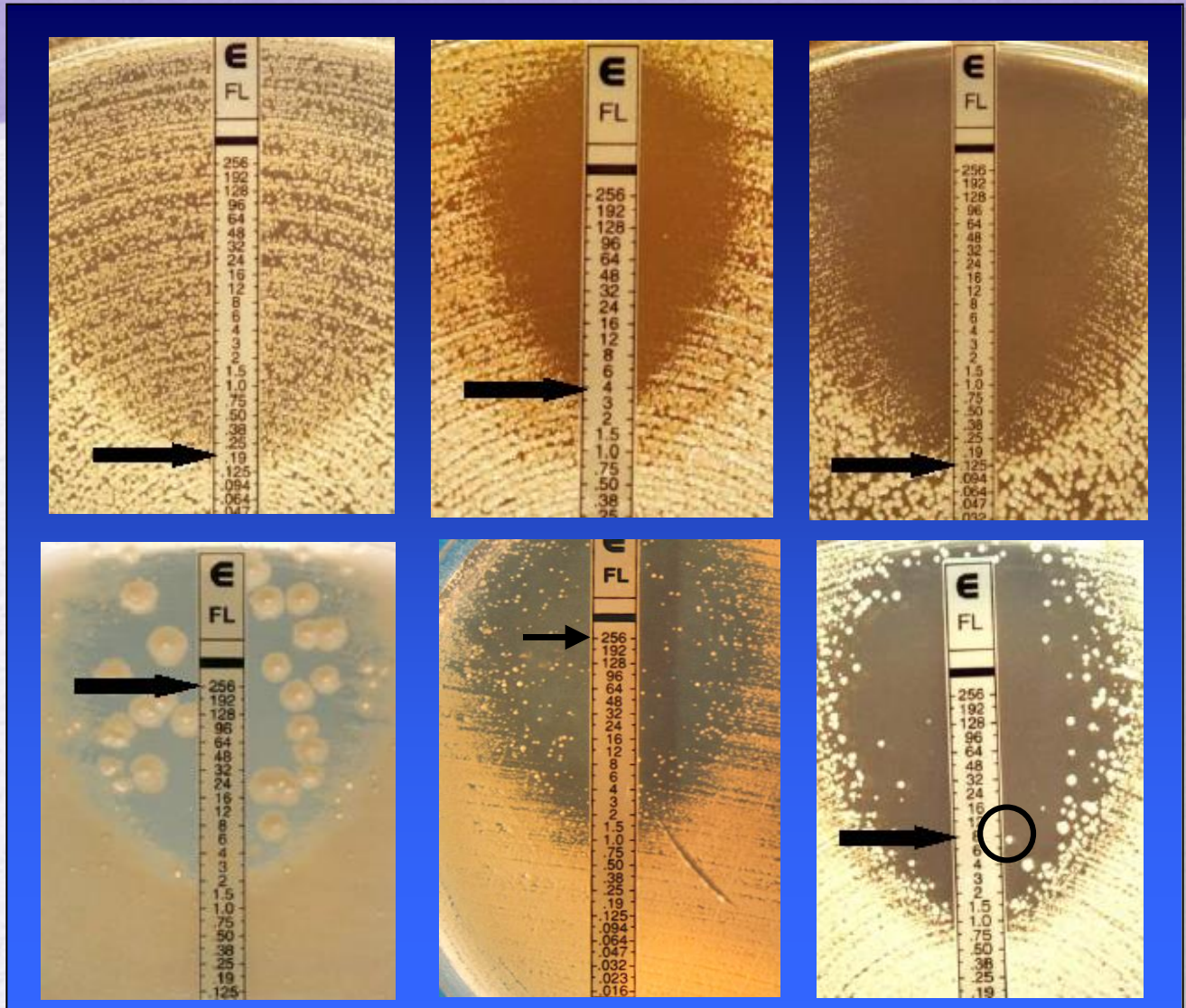
■ Problemas:

- Humedad de la placa
- Lectura azoles
- Lectura anfotericina B

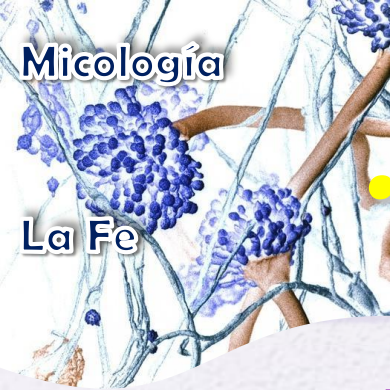


E TEST

- Azoles:



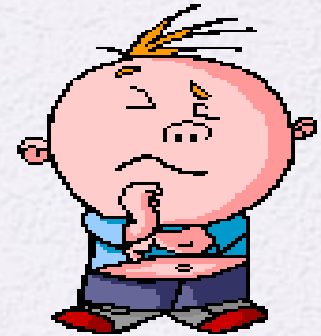
Leer a contraluz



... y en la práctica diaria?

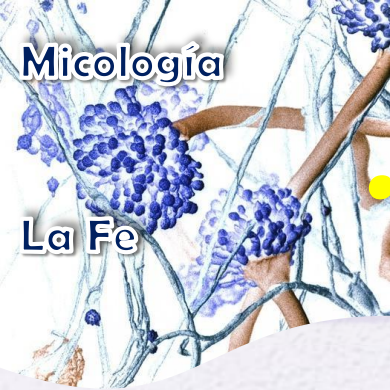
- **¿Cuándo hacer un antifungigrama?:**

- Hemocultivo
- Líquidos orgánicos estériles
- Ante un fracaso terapéutico
- Estudios epidemiológicos



- **¿Cómo hacerlo?**

- Sensititre YeastOne
 - Etest
 - Neo-Sensitab
 - M44-A2 (FLU, VOR y CAS) → levaduras
 - M51-P → h filamentosos (no dermatofitos)
- } Levaduras y filamentosos

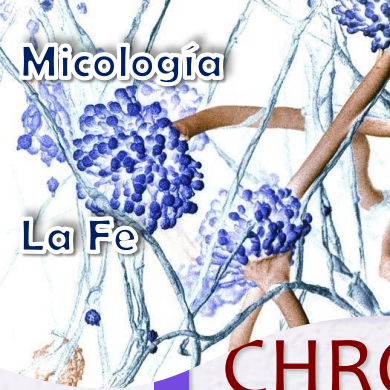


... y en la práctica diaria?

- Dilución en agar:
 - CHROMagar Candida + fluconazol (8 mg/L)

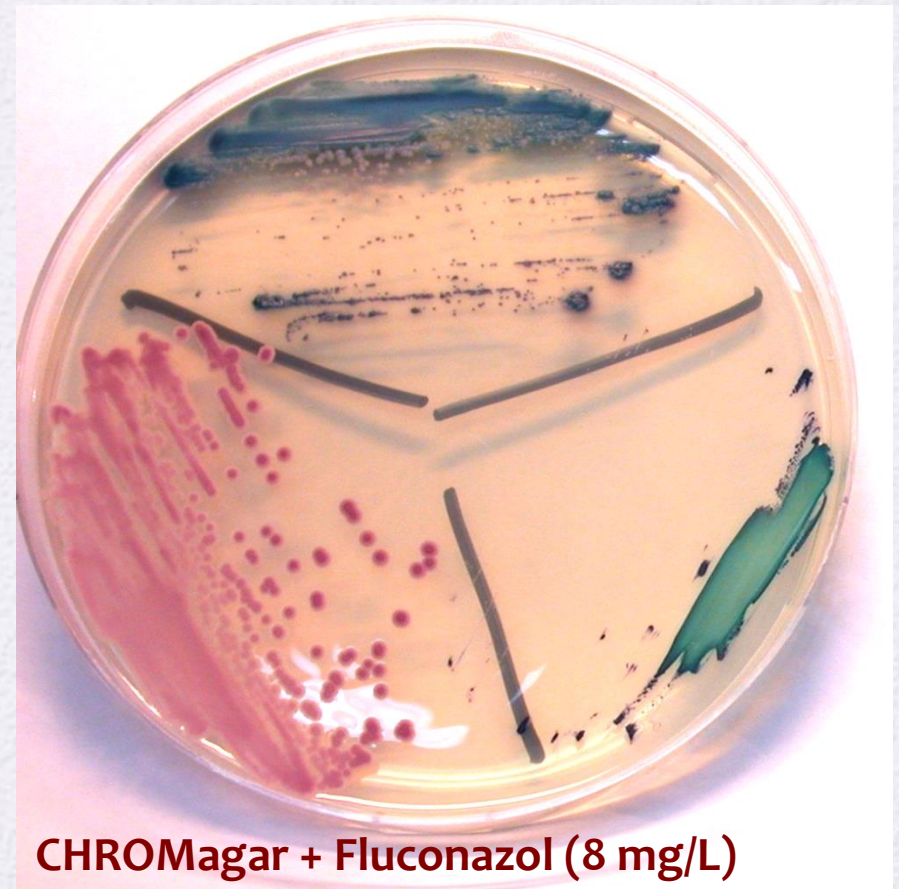
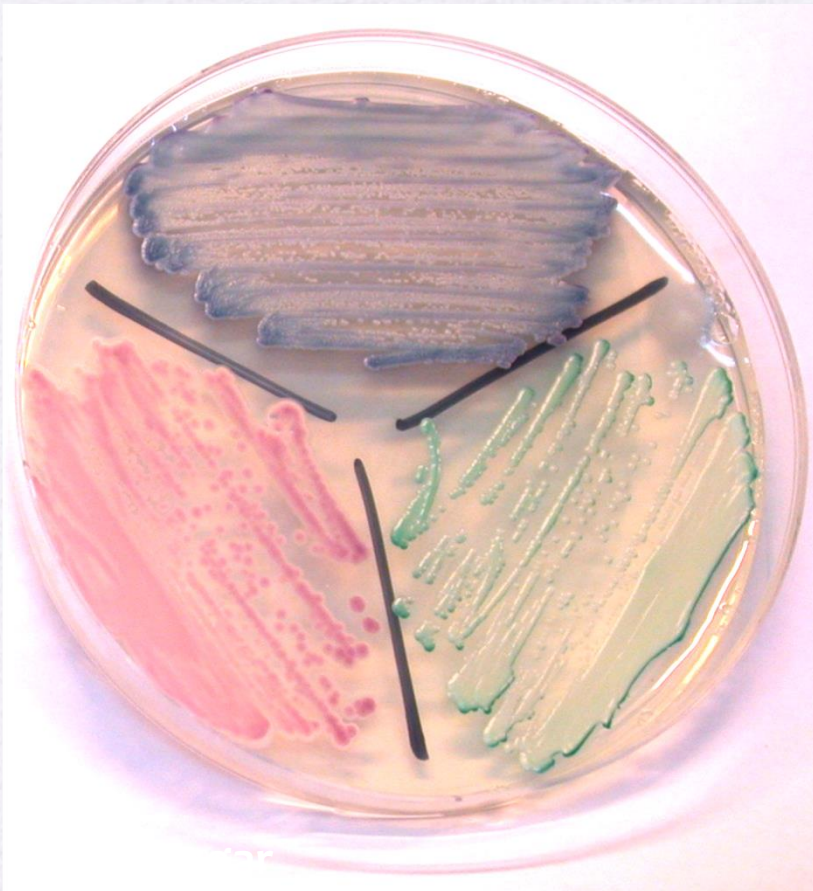
Comparative Evaluation of Macrodilution and Chromogenic Agar Screening for Determining Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*

THOMAS F. PATTERSON,^{1*} WILLIAM R. KIRKPATRICK,¹ SANJAY G. REVANKAR,¹
ROBERT K. McATEE,¹ ANNETTE W. FOTHERGILL,² DORA I. McCARTHY,²
AND MICHAEL G. RINALDI^{1,2}



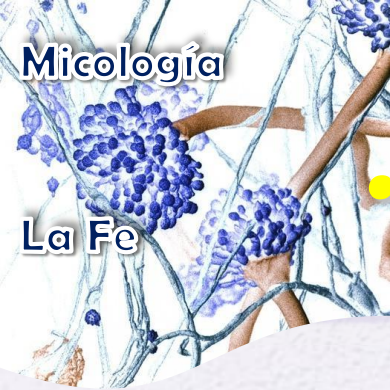
... y en la práctica diaria?

CHROMagar Candida + fluconazol (8 mg/L)



CHROMagar + Fluconazol (8 mg/L)

Patterson TF; J Clin Microbiol 1996; 34:3237-9



... y en la práctica diaria?

- **¿y si sale un aislado resistente?:**
 - **Confirmar que es un cultivo puro**
 - **Confirmar la identificación**
 - **Confirmar CMI por método estandarizado de dilución (M27-A3 o M38-A2)...**
 - **O enviar aislado a un Lab de Referencia**

y para saber algo más...

EXPERT
REVIEWS

Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods

Expert Rev. Anti Infect. Ther. 7(1), 107–119 (2009)

Emilia Cantón[†], Ana Espinel-Ingroff and Javier Pemán

[†]Author for correspondence
Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Avenida Campanar 21, 46009 Valencia, Spain
Tel.: +34 961 973 111
Fax: +34 963 868 718
canton_emi@gva.es

Antifungal susceptibility testing should identify *in vitro* resistance among a normally susceptible population or should detect the development of resistance during therapy. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]) has developed reproducible methods for testing the activity of antifungal agents against yeasts (the M27-A3, M27-S3, M44-A and M44-S2 documents) and filamentous fungi (molds; the M38-A2 document). The yeast documents describe both quality control (QC) and interpretative breakpoint parameters for several antifungal agents versus *Candida* spp. *In vitro* breakpoints, as well as a QC and reference strain, has been recently described for mold testing. Standard guidelines for testing echinocandins against molds, guidelines for testing dermatophytes, as well as a disk-diffusion method for molds, have been developed recently. However, standard parameters for minimum fungicidal concentration determinations and selection of QC strains and guidelines for testing *Malassezia* spp. are under development. Breakpoints for *Cryptococcus neoformans*, dermatophytes and *Malassezia* spp. versus any antifungal agent and for posaconazole and amphotericin B versus yeasts are not available.

Expert Rev Anti Infect Ther 2009; 7:107-119



5th Trends in Medical Mycology
2 – 5 October 2011

Valencia Conference Centre
Valencia, Spain

