



Infectio

Print ISSN 0123-9392

Infect. vol.9 no.4 Bogotá Oct./Dec. 2005



ARTÍCULO DE ACTUALIZACIÓN

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICÓTICOS

Methods for the Detection of Resistance to Antifungal Therapy

NIDIA ALEXANDRA TORRES

Hospital Universitario de San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Correspondencia. Hospital Universitario de San Ignacio, Carrera 7 No. 41-62, Bogotá, D.C., Colombia. Teléfono: 594 6161, extensión 2416 natorres.hsi@javeriana.edu.co

RESUMEN

En las últimas décadas la frecuencia de las micosis invasivas en pacientes inmunosuprimidos o con tratamientos médico-quirúrgicos ha tenido un aumento significativo.

Las especies de levaduras más frecuentemente implicadas son *Candida* y *Cryptococcus*, y el moho *Aspergillus*. Las infecciones por *Candida* ocupan un lugar importante en las infecciones hospitalarias y en las adquiridas en la comunidad. En Europa ocupa el octavo lugar (2,8%); en Estados Unidos es el cuarto patógeno de sepsis hospitalaria (8%) asociado con la mayor mortalidad (40%). En Colombia, Ecuador y Venezuela (región CELA) se demostró que *C. albicans* se aísla con frecuencia (62%), seguido por *C. parapsilosis* (11%), *C. tropicalis* (8,5%), *C. glabrata* (3,5%) y *C. krusei* (2,2%). Este aumento se atribuye, principalmente, al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, a la profilaxis antifúngica y al incremento de pacientes inmunocomprometidos (infecciones por VIH, con trasplantes o cáncer) o con múltiples dispositivos invasivos como catéteres centrales, sondas vesicales, respirador, etc.). La resistencia antifúngica era muy rara hace diez años, ahora es un problema común.

Actualmente, se necesita implementar los métodos para evaluar rutinariamente la sensibilidad antifúngica en los laboratorios de microbiología. A continuación se presenta una revisión de las pruebas de sensibilidad *in vitro* para la detección de la resistencia a los antimicóticos, entre ellas: el método de referencia M27 A2, Sensititre Yeast One, el panel colorimétrico ASTY, Fungitest, PASCO, ATB fungus, E-test, la difusión de discos, la citometría de flujo, el uso de colorantes de viabilidad y los métodos de biología molecular.

Palabras clave: resistencia, hongo, antifúngico, sensibilidad, levadura.

ABSTRACT

In the last decades, the frequency of invasive mycoses in immunocompromised patients has had a significant increase. The yeasts more frequently implied are *Candida* y *Cryptococcus*, and the mold *Aspergillus*. Infections by *Candida* have an important place in both nosocomial and acquired infections in the community: it occupies the eighth place (2.8%); in the United States, it is the fourth cause of nosocomial sepsis (8%) associated with the highest mortality (40%). In Colombia, Ecuador and Venezuela (CELA region) it was shown that *C. albicans* is isolated frequently (62%), followed by *C. parapsilosis* (11%), *C. tropicalis* (8.5%), *C. glabrata* (3.5%) and *C. krusei* (2.2%). This increase is mainly attributed to the indiscriminate use of wide spectrum antibiotics, antifungal prophylaxis and the increase of the immunocompromised patients (infections by HIV, transplanted patients, cancer patients) or with multiple invasive devices such as central catheters, urinary catheter, mechanical ventilator, etc. The antifungal resistance was very scarce ten years ago, now it is a common problem.

Currently it becomes necessary to implement reference methods to evaluate the antifungal susceptibility in microbiology laboratories' routine. A review of *in vitro* susceptibility tests for detection of resistance to antifungus drugs is presented: reference method M27 A2, Sensititre Yeast One, ASTY colorimetric panel, Fungitest, PASCO, ATB fungus, E-test, disk diffusion, flow cytometry, use of viability dyes, and molecular biology methods.

Key words: resistance, fungus, antifungal, susceptibility, yeast.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la frecuencia de las micosis invasoras en pacientes inmunosuprimidos o con tratamientos médico-quirúrgicos ha tenido un aumento significativo. Este tipo de micosis se producen en su mayoría por levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, y por el moho *Aspergillus* (1). Entre las causas de inmunosupresión se encuentran las deficiencias inmunes congénitas, las enfermedades autoinmunes, las cirugías, la diabetes, la infección por VIH, los esquemas de quimioterapia antineoplásica y los tratamientos inmunosupresores crónicos para prevenir los rechazos a los trasplantes (2). Otros factores que han incidido en el aumento de las infecciones fúngicas son el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, la profilaxis antifúngica y la práctica de la terapia empírica (3).

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, residen con frecuencia en las superficies corporales como colonizadores ambientales. En general, las personas inmunocompetentes y sanas tienen una resistencia intrínseca a los hongos (4). La infección y la enfermedad se presentan cuando existen alteraciones de las barreras protectoras de la piel o las membranas mucosas, o defectos en el sistema inmune que permiten la penetración, la colonización y la reproducción de los hongos en el huésped y, entonces, se producen las denominadas micosis que pueden ser superficiales, cutáneas, subcutáneas o sistémicas. Pueden crecer como levaduras (hongos levaduriformes), por ejemplo, *Candida albicans* y otras especies patógenas de *Candida* spp. y criptococos; o como mohos (hongos filamentosos o miceliales), por ejemplo, el género *Aspergillus* y los del orden mucorales; o pueden ser dimórficos, es decir, según sea su adaptación a los cambios ambientales pueden crecer como levadura o como moho, como *Histoplasma capsulatum* o *Paracoccidioides brasiliensis* (4).

En Europa, *Candida* spp. ocupa el octavo lugar (2,8%) como causa más común de las infecciones en sangre ya sean hospitalarias o adquiridas en la comunidad; en los Estados Unidos es el cuarto patógeno de la sepsis hospitalaria (8%), y se asocia con mayor mortalidad (40%) (5). El programa SENTRY de vigilancia de infecciones en muestras de sangre de Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica demostró que, entre 1997 y 1998, 54,3% de las infecciones eran causadas por *C. albicans*, 16,4% por *C. glabrata*, 14,9% por *C. parapsilosis*, 8,2% por *C. tropicalis*, 1,6% por *C. krusei* y 4,6% por otras especies de *Candida* spp. (6).

En Colombia, Ecuador y Venezuela (región CELA) se demostró que *C. albicans* era el

microorganismo aislado con mayor frecuencia (62%), seguido por *C. parapsilosis* (11%), *C. tropicalis* (8,5%), *C. glabrata* (3,5%) y *C. krusei* (2,2%) (7).

Según los datos de los aislamientos microbiológicos hospitalarios de las instituciones integrantes del Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana (GREBO) en Bogotá incorporados en una sola base de datos, se identificaron 1.194 aislamientos micóticos en hospitales de tercer y cuarto nivel de atención entre 2001 y 2002. Los hongos más frecuentemente aislados en las unidades de cuidado intensivo fueron: *C. albicans* (57%), *C. tropicalis* (14%), *Candida spp.* (7%), *C. guilliermondii* (5%) y *Trichosporum beigellii* (3%) (8). A diferencia de lo encontrado en otros hospitales de Latinoamérica incluidos en el estudio SENTRY, *C. tropicalis* fue más importante que otras especies de *Candida* que no eran *albicans* (8).

En nuestro país, a pesar de que *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia de las muestras clínicas y de que sus porcentajes de susceptibilidad a los antimicóticos –principalmente al fluconazol– es alta, las especies no *albicans* están aumentando significativamente con niveles de susceptibilidad no tan adecuados, principalmente de las especies *C. krusei* y *C. glabrata* (7). Se han adelantado estudios que demuestran que los hongos han incrementado su capacidad para desarrollar resistencia a los antimicóticos y, por ello, se han estandarizado pruebas de sensibilidad *in vitro* (9,10).

En un estudio llevado a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología entre 2002 y 2004 se demostró que 82% de los aislamientos eran sensibles al fluconazol, 4% sensibles según la dosis y 14%, resistentes. La mayor frecuencia de resistencia se observó en las muestras provenientes del tracto respiratorio o del tracto gastrointestinal. Este estudio demostró que hay una creciente resistencia al fluconazol en las especies de *Candida* aisladas de los pacientes con cáncer, mayor que la informada en Colombia y en Estados Unidos (10).

En la Corporación para Investigaciones Biológicas de Medellín se determinaron los porcentajes de sensibilidad de los aislamientos recibidos entre 1999 190 ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA NIDIA ALEXANDRA TORRES y 2001; se demostró que 87,4% eran sensibles al fluconazol, 4,8% sensibles según la dosis y 7,8%, resistentes (9).

La aparición de la resistencia a los agentes antifúngicos ha generado secuelas de importancia clínica y epidemiológica y han creado la necesidad de establecer métodos estandarizados *in vitro* de susceptibilidad antifúngica, reproducibles y con relevancia clínica que ayuden en la decisión terapéutica, permitan el estudio de nuevas drogas y proporcionen un medio para detectar en los estudios epidemiológicos el desarrollo de resistencia (11).

El objetivo del presente artículo es revisar los métodos de detección *in vitro* de resistencia a los antimicóticos existentes y la importancia de detectar oportunamente la presencia de cepas resistentes en los centros hospitalarios.

RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS

El aumento de la incidencia de las infecciones micóticas ha generado la necesidad de producir nuevos antifúngicos ya que los existentes no son efectivos contra las nuevas especies o han inducido el desarrollo de resistencia. La resistencia antifúngica, muy rara hace diez años, ha llegado a ser un problema en ciertas poblaciones, especialmente en las personas infectadas por el VIH con candidiasis orofaríngea (12). En estos pacientes se ha demostrado la resistencia de 33% de *C. albicans* de la cavidad oral (13).

Históricamente, la resistencia clínica se ha definido como la persistencia o el aumento de la infección a pesar de una terapia antibiótica adecuada. La respuesta clínica satisfactoria no sólo depende de la sensibilidad del microorganismo, sino también de las condiciones inmunes del huésped, la penetración y la distribución de la droga, el consentimiento del paciente para mantener el tratamiento y la ausencia de un foco persistente de infección (por ejemplo, catéteres).

La resistencia *in vitro* de un aislamiento puede ser primaria o intrínseca cuando es resistente desde antes de estar en contacto con la droga. El mejor ejemplo es la resistencia intrínseca que presenta *C. krusei* al fluconazol. La resistencia secundaria se desarrolla en respuesta a la exposición a un agente antibiótico. Este tipo de resistencia, inusual en el pasado, es hoy más frecuente y se observa principalmente en cepas de *C. glabrata* (12).

La capacidad de *C. albicans* de formar biopelículas en las superficies de catéteres, dientes y células endoteliales se ha implicado como causa de la "resistencia" clínica, a pesar de la sensibilidad *in vitro* (12).

Recientemente, la red canadiense publicó los datos de vigilancia de 1996 a 1998, período en el cual aislaron 442 cepas de *Candida* de infecciones invasoras de 51 hospitales. Diez por ciento de los pacientes presentaba tratamiento previo con azólicos; la frecuencia de *C. no albicans* era significativamente superior. Para el itraconazol y el fluconazol, los porcentajes de resistencia variaron ampliamente según la especie, así: *C. glabrata* con 14% y 9%; *C. tropicales*, 5% y 0%; *C. albicans*, 1% y 1%, y 0% en *C. parapsilosis* y *C. lusitanae* (14).

Durante el periodo comprendido entre junio de 1997 y diciembre de 2001, en la región CELA se obtuvieron 2.139 aislamientos de *Candida* spp. Mil ochocientos ochenta y cinco (88,1%) aislamientos eran susceptibles al fluconazol, 110 (5,1%) mostraron ser susceptibles según la dosis, y 144 (6,8%) fueron resistentes. Al analizar los datos se encontró que el 92,1% de los aislamientos de *C. albicans* eran susceptibles al fluconazol. Ligeramente menos susceptibles resultaron ser los de *C. tropicalis* (90%) y *C. parapsilosis* (87,7%). La menor sensibilidad se encontró en las cepas de *C. glabrata* y *C. krusei*, con 71,6% y 68,8%, respectivamente (7).

Existen varios mecanismos de resistencia antifúngica, a saber: alteración del transporte de la droga, modificaciones en la estructura de la célula blanco, disminución de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, expresión aumentada de enzimas, bombas de salida, inhibición de las "enzimas" fúngicas que activan la droga, y degradación del antifúngico por enzimas que son liberadas al medio extracelular (15).

CUÁNDO DETERMINAR LA SENSIBILIDAD *in vitro* DE LAS LEVADURAS

La identificación precoz de la especie de levadura aislada de la micosis invasiva es de gran utilidad para el médico, ya que le sirve de apoyo en la selección de la terapia. Sin embargo, según algunos estudios (3,15,16,17,19,20), se necesita implementar los métodos que evalúen rutinariamente la sensibilidad antifúngica en los laboratorios de microbiología, debido principalmente a los antecedentes de resistencia y a la introducción de nuevos productos antifúngicos al arsenal terapéutico.

Existe consenso para determinar la sensibilidad *in vitro* en toda levadura aislada de pacientes infatados con VIH con candidiasis orofaríngea, micosis invasivas, vaginitis recurrentes, brotes hospitalarios, y pacientes con profilaxia antifúngica, especialmente neutropénicos (20).

El método ideal para determinar la sensibilidad *in vitro* aún no se ha desarrollado, ya que debe tener las siguientes características: ser reproducible, fácil, económico, rápido, con buena correlación clínica, definición clara de los puntos de corte y que requiera pocos equipos (20).

El método estándar (ver más adelante), debido a diversas dificultades, no es aplicable en nuestra rutina microbiológica. Por tal motivo, es recomendable que los laboratorios se apoyen en los métodos comerciales disponibles en el mercado, previo análisis de sus ventajas y de los estudios de correlación con el método de referencia. Los métodos comerciales más conocidos son *Epsilon-test* (AB Biodisk, Suecia), *Neosensitab* (Rosco, Dinamarca), *Fungitest* (Sanofi-Pasteur, Francia), *ATB Fungus* (BioMérieux, Francia), *Asty* (Kyocuto Pharmaceutical Industries, Japón), *Sensitive Yeast One Panel* (Trek Diagnostic System, Estados Unidos), *Candifast* (Internacional Microbio/Otago Group, Italia), e *Integral Systems Yeasts* (Liofilchem Diagnostics, Italia) (19). Además, se ha avanzado en el estudio de técnicas moleculares para la detección de

la resistencia de algunas especies de *Candida*, como el AP-PCR (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*) (21).

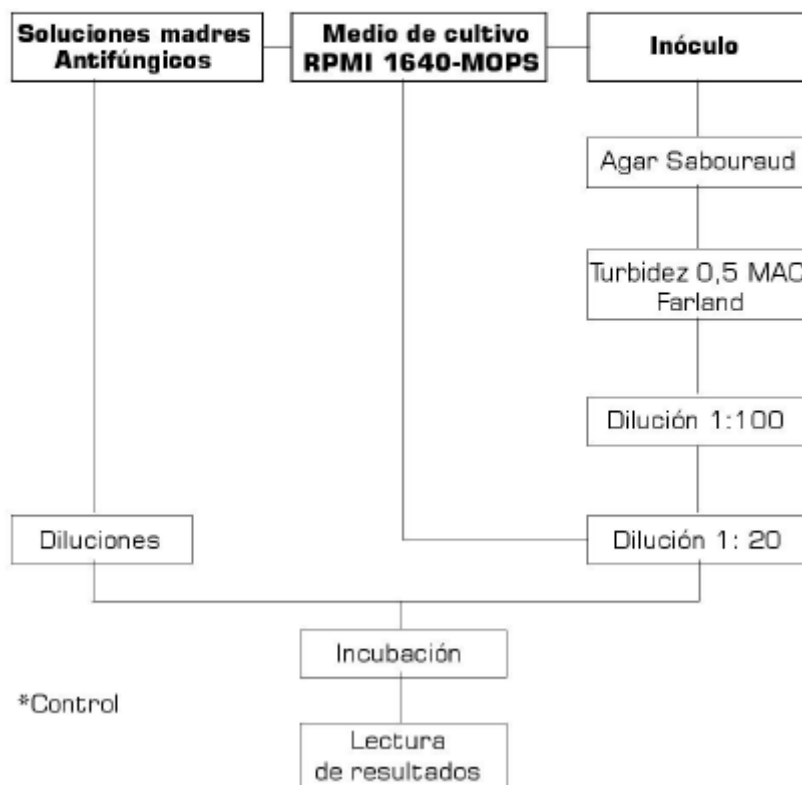
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *in vitro*

Se necesita la implementación de las pruebas de sensibilidad en el laboratorio dada la alta prevalencia demostrada en estudios previos, el uso masivo de la profilaxis antifúngica y la importancia de establecer una base de datos confiable que demuestre la relación entre los resultados *in vitro* y el éxito de la terapia clínica (16). Es evidente que la labor del laboratorio de microbiología clínica adquiere gran importancia y responsabilidad, como apoyo al médico en la selección del tratamiento antifúngico más apropiado según las circunstancias del paciente (1).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* son similares en diseño a las pruebas de los agentes antibacterianos. Las pruebas de sensibilidad *in vitro*, idealmente, proporcionan una medida cuantificable de la actividad relativa de dos o más agentes antifúngicos; deben correlacionar la actividad *in vivo* y predecir qué se puede esperar de la terapia; permiten detectar el desarrollo de resistencia en poblaciones de organismos normalmente susceptibles, y predicen el potencial terapéutico de agentes recientemente descubiertos.

MÉTODO DE REFERENCIA M27 A2

Debido a los innumerables problemas de concordancia en la sensibilidad antifúngica para las levaduras detectados en los estudios multicéntricos, el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), antes denominado NCCLS, publicó en 1997 el documento M27-A (22) que describe el método estándar de macro y microdilución, aprobado para determinar cuantitativamente la sensibilidad *in vitro* de levaduras. El medio de cultivo es el caldo RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 con MOPS; el inóculo se determina mediante espectrofotometría a 530 nm para obtener una concentración final de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mililitro (22) (véase [figura 1](#)). La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en la macrodilución para la anfotericina B se interpreta como la menor concentración del fármaco capaz de inhibir visualmente el crecimiento de la levadura; para los azoles y la 5-fluocitocina (5-FC), el punto de corte es la inhibición del 80% del crecimiento. En la microdilución, la CIM para la anfotericina B se determina con la inhibición mayor del 90% de crecimiento, y en los azoles y la 5-FC, con el 50% de inhibición.

Figura 1**Procedimiento de la técnica de microdilución M 27 A 2.**

Rex *et al.* presentaron en 1997 los criterios de sensibilidad, resistencia y sensibilidad dependiente de la dosis de las levaduras a los antifúngicos, lo cual permitió detectar la resistencia *in vitro* y ayudó a determinar la presencia de falla clínica (23) ([véase tabla 1](#)).

Es una técnica estandarizada, reproducible y que tiene validación clínica. Las placas de 96 pozos permiten la evaluación de varias muestras y la cantidad requerida de cada uno de los componentes de la técnica es pequeña; los valores de CIM se encuentran disponibles para los antimicóticos usados en la práctica clínica lo que facilita su correlación con los efectos *in vivo* y favorece el estudio de nuevos fármacos. A pesar de ofrecer grandes ventajas, esta técnica no se recomienda usarla rutinariamente en los laboratorios de microbiología (24).

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS A BASE DE CALDO

Sensititre Yeast One. Es una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa que contiene un indicador de pH (azul de Alamar) lo cual permite determinar cuantitativamente la sensibilidad *in vitro* por medio de un cambio colorimétrico a cinco antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y 5-FC.

Es un método estandarizado y con gran paralelismo al método de referencia del CLSI. En la práctica se puede utilizar para la determinación de la sensibilidad de levaduras y de hongos filamentosos. Las distintas concentraciones de los antifúngicos vienen preparadas en la placa de forma deshidratada. La determinación de la CIM se lleva a cabo por la observación de la variación del color azul de Alamar que está asociado con el desarrollo del inóculo (1). Se considera útil para incorporarlo a la rutina de laboratorio para la mayoría de las especies de *Candida*; la lectura se hace a las 24 horas para los azoles y la 5-FC y a las 48 horas para la

anfotericina B (27).

Emplea rangos similares de concentración de antifúngicos al del M27A, y muestra una adecuada relación con el método de referencia para la mayoría de las levaduras; sin embargo, se recomienda confirmar los resultados con el método de referencia cuando se prueba la susceptibilidad a los azoles con especies de *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (28).

Panel colorimétrico ASTY. Es un sistema de determinación de la sensibilidad en tiras de pozos que contienen las concentraciones -previamente deshidratadas- del antifúngico que se va a ensayar: anfotericina B, 5-FC, fluconazol e itraconazol, en rangos de concentración similares a los utilizados en el método de referencia de microdilución del CLSI. Posee un indicador colorimétrico de pH (azul de Alamar) que permite determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de los antifúngicos cuando se produce el viraje de color azul a púrpura con inhibición del crecimiento, y rojo cuando se ha desarrollado el inóculo (1).

Fungitest. Consiste de una galería con pozos que incorporan concentraciones discriminantes para conocer la sensibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, 5-FC y miconazol. La determinación de la sensibilidad es cualitativa y los criterios utilizados para la clasificación difieren de los establecidos por el CLSI para las levaduras (1). Incorpora únicamente dos concentraciones críticas, y las concentraciones de anfotericina B e itraconazol son muy altas (27).

PASCO. Es un ensayo de microdilución en caldo, más rápido y sencillo que el método de referencia de la CLSI, que incluye ocho antifúngicos: anfotericina B, 5-FC, fluconazol, ketoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol y terconazol. Contiene 10 diluciones seriadas de cada droga congelada en caldo, además de los pozos control positivo y negativo. Sólo requiere un paso para la inoculación del aislamiento que se pretende investigar (29).

Las placas con los antifúngicos son elaboradas por el fabricante lo cual elimina la necesidad de preparar el medio y las diluciones de las drogas en los laboratorios; además, el sistema incluye pruebas de control de calidad para cada lote y así disminuye la variabilidad entre laboratorios. Los estudios demuestran que es una prueba adecuada y alternativa al método de referencia NCCLS M27-A para probar la susceptibilidad de los aislamientos de *Candida* spp. clínicamente importantes contra agentes antifúngicos, excepto por el terconazol contra aislamientos de *C. krusei*. El método PASCO es más sencillo de realizar que el método de referencia y se puede usar de rutina en los laboratorios asistenciales (29).

ATB Fungus. Permite determinar en medio semisólido la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Las galerías incluyen 16 pares de cúpulas. Cuatro pares no tienen antifúngico y sirven de testigo del cultivo. Los otros pares contienen antifúngicos en dos concentraciones para categorizar las cepas. La lectura del crecimiento se hace visualmente o con el sistema ATB o mini-API. El resultado obtenido permite clasificar la cepa como sensible, intermedia o resistente, o suministrar una CIM (flucitosina y anfotericina B) (30).

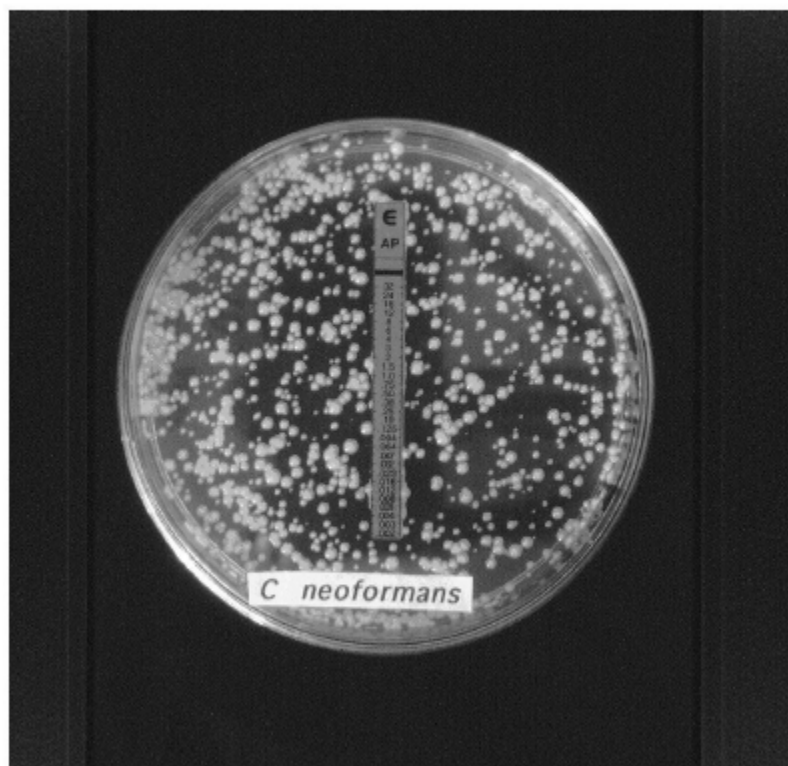
Este micrométodo se puede utilizar rutinariamente en el trabajo de los laboratorios aun con personal no experto, ya que el estuche suministrado no requiere procedimientos adicionales y permite la posibilidad de lectura automatizada (30).

MÉTODOS BASADOS EN LA DIFUSIÓN EN AGAR

E-test. Este método de sensibilidad consiste en el uso de una tira plástica delgada, inerte y no porosa, que contiene una gradiente continua y predefinida del antifúngico; se coloca sobre la superficie de una placa de agar inoculado con la levadura que se va a investigar. El medio de cultivo más recomendado es el agar RPMI más 2% de glucosa, en tampón fosfato de pH 7,0. El valor de la CIM se lee en el punto donde la elipse de inhibición intercepta la escala del antifúngico en la tira correspondiente (31). Parece ser el método de elección para la detección

de resistencia a antotericina B, utilizando el método antibiótico número 3 o RPMI más 2% de glucosa (27) ([figura 2](#)).

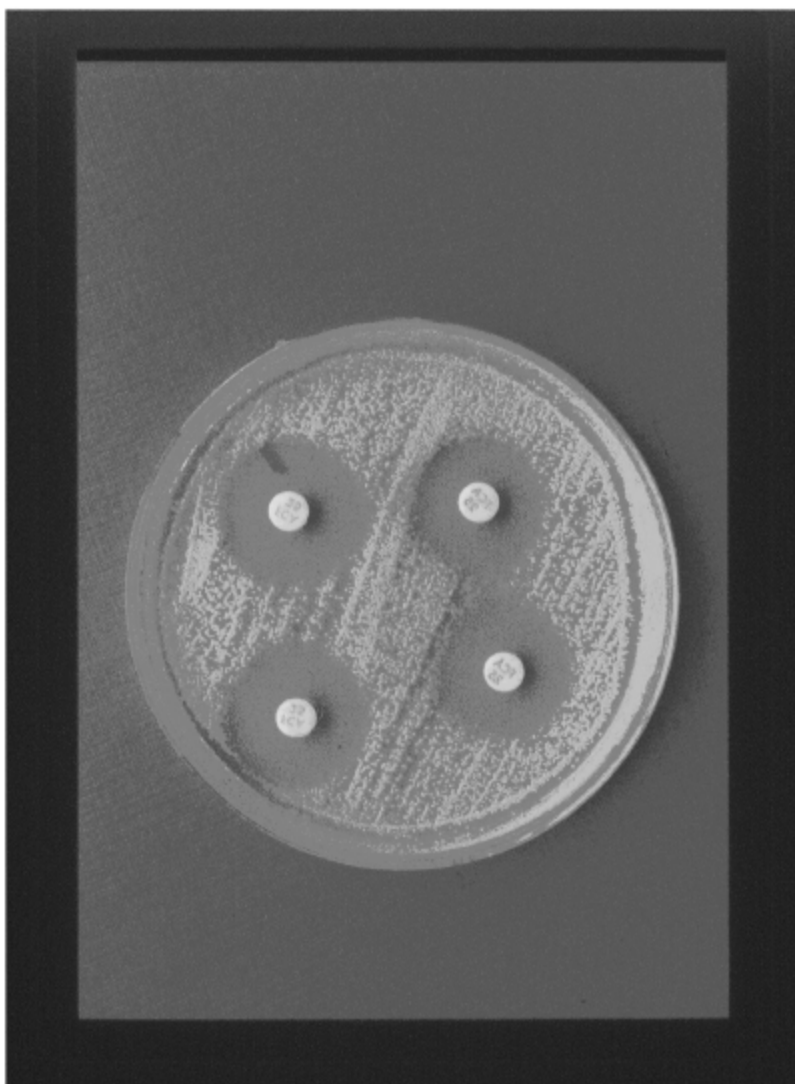
Figura 2 Técnica de E-Test



Este método ha demostrado una adecuada correlación en el método de referencia y ha sido aceptable para la mayoría de las cepas de *Candida* spp. y los azoles. Sin embargo, el crecimiento desigual de los aislamientos y la frecuente presencia de crecimiento residual (*trailing*) dificulta su lectura (19). Además, los costos de las tirillas limitan su uso rutinario en los centros asistenciales.

Método de difusión de discos. Es un método de difusión en agar, de fácil realización y con un bajo costo relativo que suministra resultados cuantitativos (medición de la zona de inhibición) y cualitativos (susceptible, intermedio, resistente). Utiliza sensidiscos del antimicótico a una determinada concentración, agar Mueller Hinton con suplemento de glucosa al 2% y con 0,5 mg/ml de azul de metileno y una suspensión de levaduras ajustada a una concentración adecuada. Las cajas con el agar Mueller Hinton con suplemento se inoculan con la suspensión de levaduras; se coloca el respectivo sensidisco y, después de la incubación, se hace la lectura en el BIOMIC, un lector de caja de Petri con un analizador digital de imagen, el cual mide los milímetros de inhibición y los convierte a CIM por medio de una curva de regresión para, luego, almacenar electrónicamente los datos (7,32).

Este método es inadecuado para distinguir los aislamientos resistentes de aquéllos susceptibles dependientes de la dosis; además, se necesitan pruebas cuantitativas adicionales cuando no se utiliza el lector de BIOMIC (18) ([figura 3](#)).

Figura 3**Técnica de sensidisco con discos de fluconazol**

Citometría de flujo y uso de colorantes de viabilidad. Se ha reconocido la utilidad de la citometría de flujo en las pruebas de sensibilidad antifúngica, especialmente cuando se estudian especies de *Candida* spp. (19,33,34,35). La prueba de susceptibilidad utilizada para el fluconazol y las equinocandinas permite obtener resultados en 5 horas o menos; es fácil de realizar, reproducible y se puede implementar en cualquier laboratorio que tenga acceso a un citómetro de flujo (36).

La tinción con los colorantes adecuados, o su ausencia, permite la detección rápida del daño causado por el hongo. Algunos estudios demuestran correlación con la citometría de flujo y la recomiendan como método de detección de la resistencia a la anfotericina B (34).

Determinación colorimétrica de glucosa. Es un método basado en la utilización de un sustrato (glucosa) por el hongo en presencia del antifúngico; la cantidad de sustrato se determina por un método colorimétrico. Usa reactivos económicos y no requiere equipos ni instalaciones especiales de laboratorio. Los resultados se obtienen entre 6 y 19 horas después, los cuales son rápidos en comparación con otros métodos que evalúan el crecimiento

microbiano. Esta técnica simple es aplicable a un rango amplio de microorganismos y agentes antibióticos usados en investigación (37).

Determinación espectrofotométrica de crecimiento. Fue propuesto por el *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). Es un método de microdilución en caldo para levaduras fermentadoras. Utiliza diluciones seriadas de las drogas antifúngicas, medio RPMI 1640 (con 2% de glucosa), inóculo de la levadura de $0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml y la lecturas de las CIM se hacen después de 24 horas de incubación utilizando un espectrofotómetro. Las CIM corresponden a la menor concentración de la droga que determina una reducción del crecimiento de 50% o más, comparado con el pozo control para los azoles (38).

Existen otros métodos más específicos para la cuantificación de la síntesis del ergosterol, que ha demostrado correlación con el método de referencia de la CLSI (19,39).

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Estos métodos se usan, además de la identificación de las levaduras, en la detección de la resistencia a los antibióticos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar para distinguir las especies de *Candida* resistentes al fluconazol. El método AP-PCR se ha utilizado para la identificación y la detección de la resistencia al fluconazol en especies de *Candida*. La técnica se basa en la amplificación de los fragmentos de ADN por PCR; se utilizan iniciadores cortos (9 o 10 bases) a una temperatura de 36°C; luego de la hibridación y la amplificación, se obtienen visualmente los resultados en el gel de electroforesis (21).

En la actualidad existen múltiples alternativas que permiten conocer, desde el laboratorio de microbiología, el efecto de los antimicóticos sobre las diferentes especies de *Candida* aisladas con frecuencia en los hospitales. Con la implementación de las técnicas de sensibilidad antimicótica se puede iniciar una terapia clínica eficaz al permitir la detección de las cepas resistentes y, también, facilitan los estudios epidemiológicos.

Agradecimientos

A Catalina de Bedout del Centro de Investigaciones Biológicas de Medellín por el suministro de las fotografías de las técnicas E-test y Sensidisco. A Carlos Arturo Álvarez, jefe de la Unidad de Infectología del Hospital Universitario de San Ignacio por su colaboración y asesoría.

REFERENCIAS

1. CARRILLO AJ, ABARCA L, QUINDÓS G. Métodos colo-rimétricos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:150-5.
2. NEELY MN, GHANNOUM MA. The exciting future of antifungal therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:897-914.
3. CUENCA M, RODRÍGUEZ JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:133-8.
4. MURRAY PR, KOBAYASHI GS, PFALLER MA, ROSENTHAL KS. *Microbiología médica.* 2a ed. Barcelona: Editorial Harcourt Brace; 1997. p.400-3.
5. EDMOND MB, WALLACE SE, MCCIIISH DK, PFALLER MA, JONES RN, WENZEL RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 1999;29:239-44.
6. PFALLER MA, JONES RN, DOERN GV *et al.* Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998.

Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:747-51.

7. BEDOUT C, AYABACA J, VEGA R *et al.* Evaluación de la sensibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. Biomédica 2003; 23:31-7.

8. CORTÉS JA, LEAL AL, ÁLVAREZ CA. Frecuencia de aislamientos micóticos en hospitales de tercero y cuarto nivel en Bogotá 2001-2002. Infectio 2003; 7: 110.

9. DE BEDOUT C, ROSERO DS, RESTREPO A, ARANGO M. Importancia del índice terapéutico (IQ) cuando se juzga la sensibilidad de especies de *Cándida* al fluconazol. Infectio 2002;6:106.

10. RIVAS J, CORTÉS JA, CUERVO SI, VANEGAS EP, PAREDES MC, BERMÚDEZ D. Resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos de *Cándida* en un centro de referencia de pacientes con cáncer, Bogotá, Colombia. Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 2004; 3:21.

11. RIVAS P, QUEVEDO R. Utilidad clínica de las pruebas de susceptibilidad antimicótica. Rev Colomb Cancerol. 2003;7:34-42.

12. THEODORE CW, KIEREN AM, RALEIGH AB. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:382-402.

13. LAW D, MOORE CB, WARDLE HM, GANGULI LA, KEANEY MG, DENNING DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. Antimicrob Chemother. 1994;34:659-68.

14. GERMAIN GS, LAVERDIÈRE M, PELLETIER R *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canadá. J Clin Microbiol. 2001;39:949-53.

15. GHANNOUM MA, RICE L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12:501-17.

16. ESPINEL A. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Newsletter. 1996;18:161-7.

17. BARRY AL, PFALLER MA, RENNIE RP, FUCHS PC, BROWN SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1781-4.

18. BARRY AL, BROWN SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. J Clin Microbiol. 1996;34:2154-7.

19. REX JH, PFALLER MA, WAISH TJ *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001;14:643-58.

20. SILVA V, DÍAZ C, FEBRÉ N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. Rev Chil Infectol. 2002; 19(Suppl.2):149-56.

21. CIRAK MY, KALKANCI A, KUSTIMUR S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98:1027-32.

22. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Second edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). Wayne PA: NCCLS; 2002.

23. REX J, PFALLER M, GALGIANI J *et al.* Development of interpretative breakpoint for antifungal susceptibility tests: conceptual framework and analysis of *in vitro*-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin Infect Dis. 1997;24:235-47.

24. REYES G, GHANNOUM M. Antifungal susceptibility testing of yeasts: uses and limitations. Drug Resistance Updates. 2000;3:14-9.

25. PINA-VAZ C, COSTA-DE-OLIVEIRA S, RODRIGUES A *et al.* Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4674-9.
26. ESPINEL-INGROFF A, BARCHIESI F, CUENCA-ESTRELLA M *et al.* Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI reference microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for *Candida* spp.: a collaborative study. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 4535-40.
27. MAZUELOS EM. Sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Métodos alternativos al CLSI. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:16.
28. CHRYSSANTHOU E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the sensititre yeast one colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27. A reference method. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4181-3.
29. ARTHINGTON BA, MOTLEY M, WARNOCK DW, MORRISON CJ. Comparative evaluation of PASCO and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeast. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2254-60.
30. CANIAUX I, GAYRAL JP, BURRITA L. Automated testing of yeast susceptibility to antifungal drugs with the ATB system, 1988 ISHAM.
31. MESSER S, PFALLER M. Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;25:77-81.
32. PFALLER MA, LIANG YU W. Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am.* 2001;15:1227-61.
33. ÁLVAREZ BA, ARROYO J, CANTON R, NOMBELA C, SÁNCHEZ M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:167-95.
34. FAVEL A, PEYRON F, DE MEO A *et al.* Amphotericin B susceptibility testing of *Candida lusitanae* isolates by flow cytofluorometry: comparison with the Etest and the NCCLS broth microdilution method. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43:227-32.
35. GREEN L, PETERSEN B, STEIMEL L, HAEBER P, CURRENT W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1088-91.
36. RUDENSKY B, BROIDIE E, YINNON M *et al.* Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J. Antimicrob Chemother.* 2005;55:106-9.
37. RIESELNMAN M, HAZEN, CUTLER J. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:333-40.
38. ESPINEL-INGROFF A, BARCHIESI F, CUENCA-ESTRELLA M *et al.* International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27A-2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 3884 -9.
39. ARTHINGTON-SKAGGS B, JRADI H, DESAI T, MORRISON CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3332-7.

Teléfono 215 3714 y 215 3517

 e-Mail
acin@etb.net.co