



Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Alfonso Javier Carrillo-Muñoz¹, Lourdes Abarca² y Guillermo Quindós³

¹Departamento de Microbiología, ACIA, Barcelona, ²Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona y ³Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultat de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

En las últimas décadas, la frecuencia de las micosis invasoras en pacientes inmunosuprimidos o con tratamientos médico-quirúrgicos ha sufrido un aumento significativo [1,2]. Este tipo de micosis se produce mayoritariamente por levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, además de que otros hongos como *Aspergillus* y también distintos patógenos emergentes entre los que está *Scedosporium prolificans* causan cada vez más infecciones [3-6]. Obtener un diagnóstico rápido y preciso que permita instaurar un tratamiento adecuado no deja de ser difícil, en parte por tratarse de patógenos poco conocidos sin tratamiento adecuado [2,7,8]. Muchos de los hongos emergentes originan problemas de resistencia intrínseca a los antifúngicos clásicos mientras que simultáneamente aparecen aislamientos clínicos resistentes pertenecientes a especies que eran sensibles, como en el caso de *Candida albicans* frente a fluconazol en los pacientes infectados por el VIH con candidiasis orofaríngea [9].

Los nuevos antifúngicos, entre los que se encuentran voriconazol, posaconazol, ravuconazol, UR-9825, las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, etc.) o las nuevas formulaciones liposómicas o asociadas a lípidos de antifúngicos clásicos como anfotericina B y nistatina entre otros [10,11], suponen una mejora de la eficacia clínica y paralelamente una reducción de la toxicidad. En cierto modo, esta mayor disponibilidad de antifúngicos, hace necesario caracterizar su potencia, es decir disponer de una base estadística de valores de actividad *in vitro* frente a distintos patógenos. Con ello se pretende establecer la posible eficacia clínica a fin de orientar al clínico en su decisión terapéutica [12]. Igualmente, es útil conocer las posibles tasas de resistencia (primaria y secundaria o bien intrínseca y adquirida) observadas *in vitro* originadas por distintas causas, como de forma particular los valores concretos de los aislamientos [6,13-15]. Es evidente que la labor del laboratorio de Microbiología clínica adquiere una gran importancia y responsabilidad, como apoyo al clínico, en la selección del tratamiento antifúngico más

adaptado a las circunstancias del paciente. Sin embargo, esta tarea se ve complicada por la falta de un adecuado grado de estandarización de las técnicas de estudio hasta la elaboración y publicación del documento M27-A por parte del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [16]. En él, se propone un método de dilución en medio líquido y en el protocolo se consensúan las distintas variables experimentales. De este modo, es posible obtener una mayor correlación entre los datos de distintos laboratorios, a la vez que una también mayor reproducibilidad. Se ha buscado establecer un mayor paralelismo entre la actuación del antifúngico *in vitro* el entorno en el que debe actuar el antifúngico con el fin de llegar a una mejor correlación *in vitro-in vivo*, pero este punto de equilibrio es difícil de encontrar con técnicas artificiales. En el documento M27-A del NCCLS, se incluyen los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, lo que permite para clasificar a las cepas en sensibles, resistentes, o sensibles-dosis dependientes. Mención aparte, merece la anfotericina B. Este antifúngico continúa siendo aún el de referencia y en el documento M27-A tan solo contempla en una modificación, la alternativa de un medio de cultivo diferente (Antibiotic M3) para discriminar con una mayor perfección las cepas resistentes. Es en otros trabajos en los que se aborda el punto de corte para la anfotericina B [14]. Este trabajo a pesar de tener cierto carácter de "documento marco", necesitará de revisiones posteriores en la medida que se vayan incorporando nuevos antifúngicos al uso terapéutico. La necesidad de disponer de un protocolo para el estudio de la sensibilidad frente a hongos filamentosos, propició la aparición del documento M38-P [17]. Este nuevo intento de consenso, ya permite en la actualidad trabajar en condiciones estandarizadas, a pesar de considerar poco útil el uso sistemático e indiscriminado de los ensayos de sensibilidad con este tipo de hongos.

La laboriosidad y complejidad de los métodos estandarizados es poco compatible con las características del laboratorio de Microbiología de tipo medio y la creciente demanda de este tipo de ensayos [18]. Si bien, las condiciones impuestas están normalizadas garantizando así la validez de los datos obtenidos e incluso en algunos casos es posible cierta automatización, se trata de un método poco práctico desde el punto de vista rutinario y no carente de cierta dificultad en la interpretación. De este modo, la aparición de métodos comerciales de sencilla y rápida ejecución que puedan tener utilidad clínica, marca una vez consolidado el método de referencia, la aceptación y su utilización en la práctica laboratorios de nivel diagnóstico [19-32]. Una de las ventajas prácticas que aportan los sistemas comercializados de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, es la facilidad con la que pue-

Dirección para correspondencia:

Dr. Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz
Apdo Postal 10178
E-08080 Barcelona
España
Fax: +34 93 429 7120
E-mail: acarrillo17@terra.es

den introducirse en el uso diario en el laboratorio de Microbiología clínica. La complejidad técnica así como las dificultades derivadas de la necesidad de disponer de antifúngicos como sustancias puras valoradas y la falta de adiestramiento técnico en la lectura e interpretación de los resultados de los métodos de referencia son puntos clave a la hora de valorar la utilidad clínica de estos resultados obtenidos. Debe tenerse en cuenta que son muchas las variables experimentales que pueden afectar a los resultados obtenidos [18-22] y, en el caso de algunos métodos, pueden verse reducidas al eliminar determinados procesos de manipulación, entre ellos el de preparación de las diluciones de antifúngico y medio de cultivo, aumentando el nivel de automatización. Tradicionalmente, la forma en la que es posible interpretar la lectura relativa a la concentración de antifúngico capaz de inhibir al inóculo (concentración mínima inhibitoria-CMI), ha sido uno de los puntos más críticos. En el caso de los antifúngicos azólicos y debido al característico efecto de arrastre conocido como *trailing effect* o crecimiento residual [18], la lectura que servía como definitiva era la menor concentración capaz de inhibir en un 50% el desarrollo del inóculo con respecto al pocillo control libre de sustancia. En el caso de la anfotericina B y también por la diferencia entre los mecanismos de acción con respecto a los antifúngicos azólicos, esa misma lectura se asignaba a aquella menor concentración que fuese capaz de inhibir totalmente el desarrollo del inóculo. En este último caso la lectura no suele presentar problemas, pero si aparecen en el caso de los antifúngicos azólicos. A pesar de que la disponibilidad de técnicas comercializadas que suplan estas dificultades facilita la labor al microbiólogo, no para todos los métodos se ha descrito la misma concordancia entre ellas y el método de referencia [23-28]. Por ello debe considerarse la validez de las mismas, como paso previo a su introducción entre las técnicas realizadas en el laboratorio.

En la actualidad tres técnicas comercializadas y de tipo, solucionan el problema causado por la lectura que es crítico para los antifúngicos azólicos, facilitando ésta por medio de un cambio de color del indicador de pH presente en el medio de cultivo. Estos métodos se han caracterizado por un alto nivel de reproducibilidad y estandarización por lo que su aceptación ha venido condicionada por la ineludible relación coste/beneficio más que por su correlación con el método de referencia. De este modo, Sensititre® Yeast One (Trek Diagnostic Systems Inc, EE.UU.) [23-25,28,29], ASTY colorimetric panel (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Japón) [26] y Fungitest® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia) [27-29], han completado la serie de técnicas disponibles en la actualidad como son las de dilución ATB-Fungus® [30,31] y difusión en agar como E-test® [32-34] y NeoSensitabs® de Rosco entre las de mayor implantación [19,20]. Las técnicas comercializadas son preferidas por el laboratorio medio por su asequibilidad y grado de estandarización, la reducción del tiempo de procesado, el coste del ensayo, así como la fiabilidad de los resultados que han de ser orientativos para el clínico [35,36].

Sensititre Yeast One®

El sistema Sensititre® Yeast One se basa en una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa que contiene un indicador de pH (azul Alamar®) que permite determinar la sensibilidad *in vitro* de forma cuantitativa y por medio de un cambio colorimétrico a cinco antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y 5-fluorocitosina). Es un método poco laborioso, estandarizado y muy con un gran parale-

lismo con respecto al método descrito en el documento M27-A del NCCLS en referencia a una gran mayoría de variables experimentales [16,23-25,28]. En la práctica, puede ser utilizado para la determinación de la sensibilidad tanto de levaduras como de hongos filamentosos. No obstante para estos últimos, tanto por las sustancias incluidas como por la utilidad crítica de los resultados propia de este tipo de hongos, hace poco útil su uso de forma rutinaria e indiscriminada. La laboriosa preparación de las diluciones de los fármacos y del inóculo características del método de referencia M27-A para levaduras [16] y M38-P para hongos filamentosos [17], está automatizada en Sensititre® Yeast One, por lo que se eliminan algunas limitaciones técnicas [18,21,23-25,28]. Las distintas concentraciones de antifúngico (diluciones dobles seriadas) usadas en la placa de forma individual para un solo aislamiento, vienen ya preparadas en la placa de forma deshidratada. Una de las características más importantes de Sensititre® Yeast One radica en la posibilidad de incorporar nuevos antifúngicos, a diferencia de otros sistemas mucho más rígidos, en la medida que sustancias como voriconazol, posaconazol, ravuconazol o caspofungina entre otros, vayan siendo introducidos en la clínica. La adición posterior del medio de cultivo en el que ya figura la suspensión de inóculo, permite la disolución de la concentración final de antifúngico correspondiente y del indicador de pH. El inóculo se ajusta turbidimétricamente y el tamaño empleado del mismo coincide con el del documento M27-A (Tabla 1). La lectura de los resultados, es decir la determinación de las CMIs, se realiza observando la variación de color del azul de Alamar® que está asociado al desarrollo del inóculo, permite la determinación de manera más clara de los puntos de corte, en comparación con la turbidimétrica. Ello reduce la influencia del efecto de arrastre característico de los antifúngicos azólicos en los métodos de dilución sobre la interpretación de los resultados [23-25,37,38]. Las concentraciones de antifúngico también coinciden con las utilizadas con el método de referencia y los puntos de corte para anfotericina B, fluconazol y 5-fluorocitosina son también los mismos, aunque en este caso esos mismos criterios se generalizan para otros géneros de levaduras y de distintas procedencias.

La concordancia [22-24] entre Sensititre Yeast One® y el método de referencia M27-A en su versión de microdilución [16], oscila según Messer y Pfaller [37], entre el 83% para los resultados obtenidos con itraconazol y el 93% para los de la 5-fluorocitosina. Resultados similares han sido obtenidos por Arikan *et al.* [38] para la anfotericina B y el fluconazol, así como también por Posteraro *et al.* [39]. Sin embargo la concordancia entre ambos métodos está influenciada por algunas variables experimentales entre las que está el tiempo de incubación, que afecta de modo distinto los diferentes géneros y especies de levaduras. Así, según Espinel-Ingroff [40], la concordancia entre ambos métodos, para *Candida albicans* era mayor a las 24 h de incubación y oscilaba entre el 97% para la anfotericina B y el 87% para fluconazol, mientras que para otras especies de *Candida* los valores llegaban a incrementarse hasta el 97-100% en el resto de antifúngicos.

Datos obtenidos por nosotros [23] con aislamientos clínicos de *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. apuntan valores de correlación entre este Sensititre® Yeast One y método de referencia, del 83% para ketoconazol, 84% para itraconazol, 94% para fluconazol, 97% para 5-fluorocitosina y 100% para anfotericina B. Estos valores corresponden las concordancias totales con un máximo de dos diluciones de diferencia entre ambos métodos para leva-

Tabla 1. Comparación de las distintas variables experimentales utilizadas en los distintos métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos y el métodos de referencia M27-A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

	NCCLS M27-A	Sensititre® Yeast One	FUNGITEST®	ASTY®
Antifúngicos	Abierto	AMB, FLZ, ITZ, KTZ, 5FC Abierto	AMB, FLZ, ITZ, KTZ, 5FC, MCZ	AMB, 5FC, FLZ, ITZ Abierto
Rango de concentraciones	Referencia	NCCLS M27-A	Dos concentraciones	NCCLS M27-A
Medio Cultivo	RPMI 1640	RPMI 1640 glucosado (2%)	RPMI 1640	RPMI 1640
pH	MOPS / 7	MOPS / 7	MOPS / 7	MOPS / 7
Inóculo (UFC/ml)	5x10 ² -2,5x10 ³	1,5-8x10 ³	10 ³	5x10 ² -2,5x10 ³
Temperatura	35 °C	35 °C	37 °C	35 °C
Incubación	24-48 h	24-48 h	24-48 h	24-48 h
Lectura	Visual Turbidimétrica	Visual Colorimétrica	Visual Colorimétrica	Visual Colorimétrica
Interpretación	Referencia	NCCLS M27-A	Propia	NCCLS M27-A
Automatización	No / Posible	Siembra	No	Posible

AMB = anfotericina B; FLZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; KTZ = ketoconazol, 5FC = 5-fluorocitosina; MCZ = miconazol.

duras del género *Candida*. En el mismo estudio, la concordancia entre los resultados obtenidos para levaduras con Sensititre® Yeast One y otras técnicas comercializadas, como el método de difusión de disco, ha sido completa para fluconazol (100%) cuando las cepas se clasificaban en las categorías de sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia (dependiente de la dosis, SDD). Únicamente se observó una discrepancia menor con itraconazol, dos con anfotericina B y cuatro con ketoconazol. En nuestros datos, hemos podido observar la dependencia existente entre la correlación y el tiempo de incubación así como también del género y especie comparada. Con respecto a otras técnicas, la concordancia se considera aceptable (>85%) al compararse Sensititre® Yeast One y E-test® para los antifúngicos anfotericina B y fluconazol [36,37].

La utilización del medio de cultivo RPMI 1640 tamponado con MOPS (pH 7), es un punto en común con el método de referencia [16], aunque la adición de glucosa en Sensititre® Yeast One constituye una diferencia que facilita un menor tiempo de incubación y también la lectura [14,40,42,43]. Sin embargo, la adición de glucosa al medio de cultivo, no parece ser adecuada para poner en evidencia las resistencias *in vitro* a la anfotericina B [15]. No obstante, la aparición de resistencias clínicas a anfotericina B es tradicionalmente baja en levaduras y su observación *in vitro* debe poder estar asociada a un fracaso terapéutico para considerarse como una resistencia real [12,13], por lo que la modificación del medio de cultivo no puede suponer más ventajas que problemas. En esta línea, existen alternativas como la del Antibiotic Medium 3 que permite discriminar las resistencias que son obtenidas en medio RPMI 1640, siendo ésta otra de modificaciones hechas al documento M27-A [16] que tiene una utilidad totalmente establecida. La resistencia a fluconazol, itraconazol y ketoconazol es más común y se asocia al empleo generalizado de derivados azólicos en el tratamiento de las candidiasis orofaríngeas en este grupo de pacientes que parece propiciar la aparición de resistencias y fracasos terapéuticos [31,43] o bien frente a *Candida glabrata* y *Candida krusei*. Este dato reafirma la necesidad de llevar a cabo una identificación completa de especie de los aislamientos de levaduras con significancia clínica, porque permite la instauración de un tratamiento

empírico antifúngico bien orientado hasta disponer de los resultados de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos del aislamiento. Según los datos obtenidos con nuestras cepas y Sensititre® Yeast One se pudo clasificar como resistentes a un 93% de cepas de *C. albicans* y al 100% de *C. glabrata* para fluconazol y el 50% y 90% respectivamente para itraconazol [23].

ASTY colorimetric panel®

ASTY colorimetric panel es un sistema de determinación de la sensibilidad en tiras de pocillos que contienen previamente deshidratadas las concentraciones de antifúngico a ensayar. Cuatro son los antifúngicos de trabajo (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol), en rangos de concentración similares a los utilizados en el método de microdilución del NCCLS de referencia. De este modo, ambos métodos son igualmente paralelos en cuanto a ejecución y únicamente la presencia de un indicador colorimétrico de pH constituye una diferencia. Este indicador de color permite determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los antifúngicos cuando se produce el viraje de color de azul, sin crecimiento a púrpura con inhibición del crecimiento y rojo cuando se ha desarrollado el inóculo. El sistema permite la incorporación de los nuevos antifúngicos en la medida que estos estén disponibles.

En la valoración del método hecha por Pfaller *et al.* [26], con cepas de colección de control de calidad del NCCLS, se obtuvo una excelente correlación con respecto al método de referencia. Los valores dependieron del antifúngico y únicamente para itraconazol los resultados fueron una dilución mayor con respecto al método de referencia, siendo la correlación entre ambos del 95% para la *C. parapsilosis* ATCC 22019 y del 100% para la *C. krusei* ATCC 6258. La reproducibilidad del método estudiada con cepas de referencia [26] dependió del período de incubación oscilando entre el 77% y el 99% de las CMI leídas a 24 h que estaban dentro del rango de tres CMI. Ese porcentaje pasaba al 83%-100% a las 48 h de incubación en cada cepa estudiada. Para las cepas de origen clínico evaluadas, la comparación entre el sistema ASTY y el de referencia para los cuatro antifúngicos fue del 93% con CMIs de ASTY a 24 h y del 96% con CMIs

Tabla 2. Resultados comparativos (porcentajes de acuerdo) de la concordancia entre los distintos métodos comercializados para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos y el método de referencia M27-A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), publicados por distintos autores para diferentes géneros y especies de levaduras.

Organismo	Antifúngico	Sensititre Yeast One [40]		Fungitest [27]		ASTY [26]	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Candida albicans</i>	AMB						
		97	97	100	nd	99	99
	5FC	87	56	98	nd	92	98
	ITZ	89	54	98	nd	91	96
	FLZ	87	60	94	nd	95	95
	KTZ	90	56	88	nd	nd	nd
<i>Candida glabrata</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	98	100
	5FC	92-99	73-100	100	nd	95	99
	ITZ	93-100	66-97	56	nd	93	98
	FLZ	95-98	73-99	38	nd	96	100
	KTZ	93-100	66-97	44	nd	nd	nd
<i>Candida krusei</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	83	100
	5FC	92-99	73-100	80	nd	48	100
	ITZ	93-100	66-97	70	nd	91	100
	FLZ	95-98	73-99	75	nd	85	100
	KTZ	93-100	66-97	75	nd	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	89	100
	5FC	92-99	73-100	100	nd	99	99
	ITZ	93-100	66-97	100	nd	81	98
	FLZ	95-98	73-99	100	nd	99	100
	KTZ	93-100	66-97	100	nd	nd	nd
<i>Candida tropicalis</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	100	97
	5FC	92-99	73-100	100	nd	92	99
	ITZ	93-100	66-97	75	nd	90	67
	FLZ	95-98	73-99	90	nd	94	70
	KTZ	93-100	66-97	75	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus neoformans</i>	AMB	nd	76	100	nd	nd	nd
	5FC	nd	96	100	nd	nd	nd
	ITZ	nd	96	100	nd	nd	nd
	FLZ	nd	98	70	nd	nd	nd
	KTZ	nd	90	95	nd	nd	nd
Global	AMB	nd	90-99	100	nd	96	99
	5FC	nd	nd	95	nd	90	99
	ITZ	nd	nd	83	nd	90	92
	FLZ	nd	nd	76	nd	94	95
	KTZ	nd	nd	77	nd	nd	nd

AMB = anfotericina B; FLZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; KTZ = ketoconazol, 5FC = 5-fluorocitosina; MCZ = miconazol.
nd = no determinada.

de ASTY a 48 h (Tabla 2). Al igual que con las cepas de referencia la valoración del método depende del antifúngico empleado y el período de incubación siendo mejor a las 48 h [26], ya que para itraconazol el acuerdo entre este método y el de referencia es del 90% a 24h y 92% a 48h; para la 5-fluorocitosina es del 90% y 99% a 24h y 48 h respectivamente y para la anfotericina B del 96% y 99% en los mismos tiempos de incubación (Tabla 2) [26]. Para fluconazol el acuerdo fue del 94% a 24 h y del 95% a 48 h de incubación [26]. Al igual que en resto de métodos comercializados, la concordancia también parece depender del género y de la especie de levadura. En todos los casos las discrepancias se atribuyeron a la presencia de bajas CMI o fuera del rango inferior de concentración de antifúngico obtenidas mediante el sistema ASTY [26].

Fungitest®

El sistema Fungitest consiste en una galería con pocillos que incorporan concentraciones discriminantes para conocer la sensibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol 5-fluorocitosina y miconazol. Los pocillos se inoculan con suspensiones de 10^3 UFC/ml. El método utiliza RPMI 1640 como medio de cultivo pero la determinación de la sensibilidad, a diferencia del anterior y del método de referencia, es cualitativa no cuantitativa. Además, los criterios utilizados para la clasificación

difieren de los establecidos por el NCCLS para las levaduras, puesto que para la anfotericina B se emplean 2 y 8 $\mu\text{g/ml}$; para 5-fluorocitosina 2 y 32 $\mu\text{g/ml}$; para fluconazol 8 y 64 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 y 4 para itraconazol y ketoconazol; 0,5 y 8 $\mu\text{g/ml}$ para miconazol [27-29].

Los resultados obtenidos por Davey *et al.* [27] de forma comparativa con el método de microdilución en medio líquido (M27-A) presentan una concordancia total para anfotericina B con independencia de la especie ensayada y únicamente tras categorizar la sensibilidad de las cepas en sensibles, intermedias o resistentes. La concordancia global con el método de referencia fue superior al 70% para todas las especies y superior al 75% para los cinco antifúngicos incluidos. Para fluconazol e itraconazol, esa concordancia fue del 75 y 83% respectivamente en el conjunto de cepas estudiadas [27], destacando el 100% para ambas técnicas en *Candida parapsilosis* ó el 94-98% para *C. albicans* [27]. No existieron discrepancias mayores con elevada frecuencia (3%) y que afectaron a *C. albicans*, *C. glabrata* y *Candida tropicalis*, pero si fueron significativas las discrepancias menores. En estos casos cepas sensibles o resistentes de *C. glabrata* y *C. krusei* fueron clasificadas como intermedias o viceversa, afectando sobre el total de cepas estudiadas a un 23% para el fluconazol y un 16% para itraconazol [27]. Algunas de las cepas resistentes a fluconazol (2 de 12 cepas) e itraconazol (2 de 10 cepas) fueron clasificadas

como sensibles por medio de Fungitest®. Este mismo hecho fue corroborado por los resultados de Witthuhn *et al.* [29] en especial con cepas intermedias que luego fueron resistentes por medio del método de microdilución de referencia. La causa de estas divergencias podría estar en la influencia del tamaño de inóculo empleado y/o tiempo de incubación, según Davey *et al.* [27], aparte de los criterios de clasificación.

En conclusión, puede afirmarse que los métodos colorimétricos presentan una buena reproducibilidad intra e inter-laboratorio, así como una concordancia aceptable con respecto al método de referencia del documento M27-A. No obstante, los valores de concordancia con respecto al de referencia dependen del género y especie y de los tiempos de incubación en los que se realiza la lectura y la posterior interpretación y comparación. El empleo de alguno

de éstos métodos en el laboratorio de microbiología clínica depende de la relación coste/beneficio así como de la posible inclusión de nuevos antifúngicos en un futuro. El elevado grado de estandarización entre los distintos lotes de pruebas, supone una mejora en la calidad de los ensayos y de los resultados obtenidos a la vez que la realización de numerosas pruebas de forma simultánea favorece una reducción de coste de ensayo. De ellos los sistemas ASTY y Sensititre® Yeast One son los que más se ajustan a las condiciones de experimentación expuestas en el documento de referencia, basándose en un método de microdilución en medio líquido y ofrecen una mayor concordancia global para fluconazol e itraconazol con respecto al de referencia (Tabla 2), mientras que la posibilidad de detectar cepas resistentes a fluconazol e itraconazol por medio de Fungitest es limitada [27].

References

- Beck-Sague C, Jarvis WR. The National Nosocomial Infection Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993;167:1247-1251.
- LaRocco MT, Burgert SJ. Fungal infections in the transplant recipient and laboratory methods for diagnosis. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:143-146.
- Trick WE, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections in the 1990s. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:2-6.
- Marín J, Sanz MA, Sanz GF, *et al.* Disseminated *Scedosporium inflatum* infection in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:759-761.
- San Millán R, Quindós G, Garaizar J, Salesa R, Guarro J, Pontón J. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by random amplification polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2270-2274.
- Viscoli C, Castagnola E. Emerging fungal pathogens, drug resistance and the role of lipid formulations of amphotericin B in the treatment of fungal infections in cancer patients: a review. *Int J Infect Dis* 1999;3:109-118.
- Pontón J. Avances en el diagnóstico de la candidiasis sistémica. *Rev Iberoam Micol* 1996;13:s16-s19.
- Rüchel R. Mycotic infections in the immunocompromised patient. *Rev Iberoam Micol* 1996;13:s20-s24.
- Quindós G. Tratamiento de las candidiasis orofaríngeas. *Rev Iberoam Micol* 1996;13:s11-s15.
- Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M. Nuevos antifúngicos. *Rev Esp Quimioter* 1999;12:181-204.
- Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2001;18: 4-7.
- Odds FC. Personal opinion: Can antifungal sensitivity tests predict clinical treatment outcomes? *Rev Iberoam Micol* 1997;14:83-84.
- Odds FC. Should resistance to azole antifungals *in vitro* be interpreted as predicting clinical non-response? *Drug Resistance Updates* 1998;1:11-15.
- Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioter* 2000;13:161-166.
- Espinel-Ingroff A. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical applications of antifungal resistance. *J Mycol* 2000;38:293-304.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M-27A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Carrillo-Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós-Andrés G. Métodos de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. I. Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:105-110.
- Carrillo-Muñoz AJ, Abarca L, Quindós G. Comité para la Estandarización de los Antifúngicos de la Asociación Española de Micología. Aportaciones del comité de la AEM a la estandarización de las pruebas de estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 1996;13:s101-s104.
- Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Estivill D, Montsant L, Torres-Rodríguez JM. Evaluación de un método de difusión en agar para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos frente a cepas de referencia. *Rev Esp Quimioter* 1995;8:221-228.
- Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:367-381.
- Pemán García J, Cantón-Lacasa E. Las pruebas de sensibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica. *Rev Esp Quimioter* 1996;9:17-20.
- Carrillo-Muñoz AJ, Del Valle O, Tur-Tur C, *et al.* Determinación mediante el sistema sensititre® de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos en levaduras de interés clínico. *Rev Esp Quimioter* 1999;12:126-135.
- Pfaller MA, Barry AL. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeasts isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:1992-1996.
- Pfaller MA, Vu Q, Lancaster M, *et al.* Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeasts isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:1625-1628.
- Pfaller MA, Arikian S, Lozano-Chiu M, *et al.* Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1998;36:2609-2612.
- Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. Comparative evaluation of Fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1998;36:926-930.
- Swinne D, Raes-Wuytack C, Van Looveren K, Desmet P. Comparative evaluation of Fungitest, NeoSensitabs and M27-A NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 1999;42:231-237.
- Witthuhn F, Toubas D, Béguinot I, *et al.* Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:864-866.
- Quindós G, Salesa R, Carrillo-Muñoz AJ, *et al.* Multicenter evaluation of ATB Fungus: a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *Chemotherapy* 1994;40:245-251.
- Quindós G, San Millán R, Burgos A, *et al.* Evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de los serotipos A y B de *Candida albicans* mediante el método ATB Fungus. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1995;13:209-212.
- Linares MJ, Muñoz JF, Solís F, Rodríguez FC, Valero A, Casal M. Study of susceptibility of yeast isolates of clinical interest to five antifungal agents using the E-test. *Rev Esp Quimioter* 1998;11:64-69.
- Torres-Rodríguez JM, Madrenys N, Jiménez T, Saballs P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micro-método de dilución estandarizado y E-test. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 115-118.

34. Rubio Calvo MC, Gil Tomás J, Benito Ruesca R. Las pruebas *in vitro* en la evaluación de los agentes antifúngicos. *Rev Esp Quimoter* 1993;6:21.
35. Rubio Calvo C, Gil Tomás J, Benito Ruesca R, Quindós, G. Sistemas de valoración *in vitro* de los antifúngicos. En Casal, M. (Ed.) Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos. Córdoba, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 1996:345-388.
36. To WK, Fothergill AW., Rinaldi MG. Comparative evaluation of microdilution and Alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2660-2664.
37. Messer SA, Pfaller MA. Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;25:77-81.
38. Arikan S, Gur D, Akova M. Comparison of Etest, microdilution and colorimetric dilution with reference broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses* 1997;40:291-296.
39. Posteraro B, Romano L, Sanguinetti M, Morace G, Fadda G. Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: Comparison with the broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:29-36.
40. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, *et al.* Multicenter comparison of the Sensititre yeast one colorimetric antifungal panel with the National Committee for clinical laboratory standard M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:591-595.
41. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra M, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal Susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001;39:525-532.
42. Cantón E, Pemán J, Carrillo-Muñoz A, *et al.* Fluconazole susceptibilities of bloodstream *Candida* spp. Isolates as determined by National Committee for Clinical Laboratory Standards Meted M27-A and two other methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2197-2200.
43. Sugar AM. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs. What are we doing? *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1907-1912.