



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades

Manuel Cuenca-Estrella*, Ana Alastruey-Izquierdo, Alicia Gómez-López y Araceli Monzón

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
ECOFF
Antifúngicos
Control de calidad

En esta revisión se incluye una actualización sobre las aplicaciones de las técnicas de referencia de los estudios de sensibilidad en levaduras, sobre la utilidad de las técnicas comerciales, y sobre las recomendaciones e indicaciones para realizar estos estudios en la práctica clínica y en programas de vigilancia epidemiológica para conocer la aparición de resistencias. Asimismo se revisan las últimas novedades en el proceso de definición de los puntos de corte, para interpretar los estudios de sensibilidad a los antifúngicos que están llevando a cabo tanto el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) como el Clinical Laboratory Standards Institute estadounidense (CLSI).

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Antifungal susceptibility testing in yeasts. Update and novelties

ABSTRACT

Keywords:
ECOFFs
Antifungal agents
Quality control

This text reviews and updates the uses of the reference procedures for antifungal susceptibility testing in yeasts, the reliability of the commercial methods and the guidelines for the use of these procedures for patient management and for epidemiological reasons to determine the susceptibility profile and the emergence of resistances. Novelties in the procedures of setting clinical breakpoints of antifungal agents by both the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the US Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) are also reviewed.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

En las últimas 2 décadas se ha producido un desarrollo significativo en las técnicas para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos. En primer lugar se desarrollaron métodos estandarizados, reproducibles y con procedimientos para asegurar la calidad de los resultados. Tanto el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) como el Clinical Laboratory Standards Institute estadounidense (CLSI) han publicado procedimientos de referencia para conocer la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras y de hongos filamentosos, métodos que se revisan y actualizan periódicamente^{1,2}.

Tras la estandarización, el objetivo de ambos comités ha sido establecer puntos de corte para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad. Actualmente, los procedimientos del EUCAST y del CLSI para definir puntos de corte son muy similares^{3,4}, y se fundamentan en el análisis poblacional de las CMI (concentración mínima

inhibitoria) de los microorganismos, así como en la aplicación de diferentes variables farmacocinéticas y farmacodinámicas, que permiten relacionar los resultados del antibiograma con la respuesta clínica a un determinado antimicrobiano. Asimismo se han definido los puntos de corte epidemiológicos, valores que ayudan a separar la población normal sensible de un grupo de microorganismos de la población resistente, que en muchas ocasiones presenta mecanismos de resistencia. Estos puntos de corte epidemiológicos pueden utilizarse para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad, en casos en los que no hay suficiente información para establecer puntos de corte clínicos^{1,3}.

Los puntos de corte disponibles hoy en día se caracterizan por ser específicos para cada especie, por estar basados en un conjunto de datos epidemiológicos, farmacodinámicos y clínicos, y por ser revisados periódicamente, según se va disponiendo de nuevos datos procedentes de estudios de epidemiología molecular y del análisis de su correlación clínica⁴.

Por otra parte, las técnicas comerciales para realizar estudios de sensibilidad se han implantado en los laboratorios clínicos. Estos métodos son muy útiles para conocer la resistencia de las levaduras a los azoles o a las equinocandinas, y pueden emplearse para instaurar el

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mcuenca-estrella@isciii.es (M. Cuenca-Estrella).

tratamiento antifúngico más adecuado en cada paciente. Los expertos aconsejan utilizar técnicas con validación clínica y confirmar las resistencias mediante los procedimientos de referencia en caso de detectar cepas con resistencia *in vitro*⁵.

Por último, varias sociedades internacionales y españolas han elaborado recomendaciones sobre cuándo y cómo realizar los estudios de sensibilidad en levaduras. Tanto la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)⁶ como la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)⁷ han publicado recomendaciones en este campo en los 2 últimos años, incluyendo indicaciones sobre las técnicas de referencia, la utilidad de los puntos de corte y fiabilidad diagnóstica de las técnicas comerciales.

En esta revisión se incluye una actualización sobre las técnicas de referencia de los estudios de sensibilidad en levaduras, sobre la utilidad de las técnicas comerciales, y sobre las recomendaciones e indicaciones para realizar estos estudios en la práctica clínica y en programas de vigilancia epidemiológica para conocer la aparición de resistencias.

Métodos de referencia

El EUCAST y el CLSI han publicado actualizaciones de sus procedimientos de referencia para realizar estudios de sensibilidad en levaduras^{1,2}. En 2012 se ha publicado el documento *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2*. Este estándar modifica algunas de las indicaciones recogidas en la versión anterior (documento 7.1), mantiene la microdilución como técnica de referencia y las recomendaciones sobre cómo asegurar la calidad de los resultados con cepas control de calidad, incluyendo una actualización de los rangos de control de estas cepas, así como las normas para preparar las soluciones de antifúngicos, los medios de cultivo y las placas de sensibilidad.

El documento 7.2 del EUCAST contiene nueva información relacionada con los disolventes que deben utilizarse para caspofungina, micafungina y fluconazol. Es de especial relevancia la recomendación sobre el disolvente de las equinocandinas, ya que se aconseja utilizar DMSO (dimetil sulfóxido) y abandonar el agua y el suero fisiológico. Esta indicación se basa en estudios que han demostrado que la utilización de DMSO como disolvente mejora la reproducibilidad de las CMI de equinocandinas y ayuda a distinguir con mayor fiabilidad la población sensible de la resistente⁸.

También se modifican las indicaciones sobre el almacenamiento de las placas de microdilución. Las placas se deben meter en bolsas de plástico o envolver en papel de aluminio y guardar congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, o a una temperatura inferior, durante un máximo de 6 meses o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 mes como máximo. Una vez que las placas se han descongelado no deben volver a congelarse.

En cuanto a la incubación de las placas, se recomienda incubarlas sin agitación a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones ambientales durante 24 ± 2 h. Una densidad óptica $\leq 0,2$ en la lectura espectrofotométrica de las placas inoculadas indica escaso crecimiento. Esto puede observarse en algunas cepas de *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii*. En este caso se deben incubar de nuevo las placas de microdilución durante otras 12-24 h y volver a realizar la lectura espectrofotométrica. Si no se alcanza la densidad óptica de 0,2 al cabo de 48 h se considera que el resultado no es valorable y el estudio debería repetirse.

Una de las principales novedades del documento 7.2 son las recomendaciones sobre los estudios de sensibilidad con *Cryptococcus* spp. Estas especies son levaduras no fermentadoras, lo que compromete el crecimiento en placas de microdilución según los protocolos definidos por el EUCAST. Un reciente y amplio estudio exploró los efectos de la variación en la metodología de las pruebas de sensibilidad en comparación con los procedimientos estándar⁹. Las variables analizadas incluyeron el medio de cultivo (RPMI frente a YNB [*yeast*

nitrogen base —levadura nitrógeno base—]), la concentración de glucosa (el 0,2 frente al 2%), la fuente de nitrógeno (sulfato amónico a varias concentraciones), la temperatura (30 frente a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$), la incubación de las placas con y sin agitación y el tamaño de inóculo (10^3 , 10^4 y 10^5 células/ml). Se compararon las tasas de crecimiento y las CMI en todas estas condiciones. Aunque el uso del medio YNB, la reducción de la temperatura de incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la agitación de las placas durante la incubación mejoraron el crecimiento, no hubo diferencias significativas en las CMI obtenidas con los diferentes métodos. Por ello, el documento recomienda que se adopte la metodología EUCAST estándar para los estudios de sensibilidad con *Cryptococcus* spp. y que las placas se lean cuando la densidad óptica esté por encima de 0,2. En casos donde el crecimiento es insuficiente se sugiere repetir el test incubando las placas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En cuanto al procedimiento de referencia del CLSI, este se recoge en el documento *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. Document M27-A3*, así como en varios suplementos (*documents M27-S*)^{2,10}. El comité estadounidense no ha realizado muchas modificaciones de su procedimiento desde 2008. Las novedades más destacables se refieren a la obtención de la CMI a las 24 h de incubación¹¹. La norma general del CLSI aconseja la lectura de las placas tras 48 h de incubación, sin embargo se ha observado una menor reproducibilidad y sobrestimación de las resistencias *in vitro* en algunas ocasiones. Por ello se aconseja la obtención de los valores de CMI a las 24 h de incubación en algunos casos concretos si el crecimiento es suficiente para realizar la lectura de las placas¹⁰. Esta indicación parece ser de especial importancia en la determinación de las CMI de las equinocandinas y en cepas que tengan un crecimiento residual muy marcado (efecto *trailing*) en los estudios con azoles, como en algunas cepas de *Candida tropicalis*.

Otra de las novedades de los procedimientos del CLSI ha sido la actualización del protocolo de referencia para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos mediante el método de difusión en agar, *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline—Second Edition, Document M44-A2*¹². Este documento recoge las normas para realizar estos estudios con discos de fluconazol y de voriconazol, con agar Mueller-Hinton sólido con 2% de glucosa y con azul de metileno para perfilar los halos de inhibición con mayor claridad. Este método se considera como una técnica de *screening*, más rápida que las realizadas mediante microdilución, que permite detectar con fiabilidad la resistencia de *Candida* a fluconazol. El CLSI aconseja que las cepas resistentes sean confirmadas por la microdilución. La segunda edición de este documento incluye normas de aseguramiento de la calidad, describe cepas e intervalos de control, así como una regla para correlacionar el diámetro de los halos de inhibición con los valores de CMI.

No obstante, los principales esfuerzos renovadores del CLSI y del EUCAST han sido los relacionados con la metodología para establecer puntos de corte. Los primeros puntos de corte se describieron en 1997 y fueron incluidos en la primera edición del documento M27-A del CLSI. Eran puntos de corte de fluconazol e itraconazol, y estaban basados en distribuciones de CMI así como en la respuesta clínica de pacientes con candidiasis orofaríngea según la regla 90-60, ya que apenas se analizaron datos de pacientes con candidiasis invasiva por cepas resistentes a los azoles^{13,14}.

En los últimos años se ha modificado el método para establecer puntos de corte (tabla 1). En primer lugar, tanto el EUCAST como el CLSI recopilan cientos de CMI de diversos orígenes geográficos de un determinado antifúngico, para cada una de las especies fúngicas^{1,15-19}. Se hace un análisis poblacional y se establecen los valores de CMI de distribución central, la denominada *población salvaje*. Tras ello se define un punto de corte epidemiológico (ECOFF, del inglés *epidemiological cut-off*), a partir del cual se encuentra una población con una CMI más elevada que la de la salvaje, que se considera resistente *in vitro* al antifúngico. Varios estudios publicados han demostrado que

Tabla 1

Descripción de los procedimientos del EUCAST y del CLSI para establecer puntos de corte de los antimicrobianos

Fases	EUCAST	CLSI
1	Identificar la dosis de antimicrobiano que se emplea en cada país europeo	Examinar los datos microbiológicos disponibles
2	Definir las <i>poblaciones salvajes</i> de cada especie microbiana y determinar los puntos de corte epidemiológicos	Conocer los mecanismos de resistencias y su relación con los valores de CMI y su correlación in vivo
3	Describir la farmacocinética del antimicrobiano	Examinar los parámetros farmacocinéticos del antimicrobiano
4	Examinar la farmacodinamia incluyendo la realización de simulaciones de Monte Carlo	Examinar los parámetros farmacodinámicos del antimicrobiano
5	Explorar la correlación entre los valores de CMI y la evolución clínica de los pacientes	Analizar la evolución clínica de los pacientes

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; CMI: concentración mínima inhibitoria; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

gran parte de estas cepas son mutantes resistentes con modificaciones en su ADN que determinan la aparición de los mecanismos de resistencia^{20,21}.

Algunos de los puntos de corte actuales están basados solo en el ECOFF y en datos farmacocinéticos, ya que no se dispone de datos clínicos suficientes para encontrar una correlación con los datos de sensibilidad in vitro. Además se están analizando las distribuciones de CMI de diversos antifúngicos para varias especies fúngicas, como paso previo para establecer los puntos de corte. A este respecto destacan estudios recientes con *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* y con especies poco habituales de *Candida*, que están recopilando CMI de laboratorios de diferentes países y que ya han publicado algunas de sus conclusiones^{3,22}.

El procedimiento para establecer puntos de corte continúa con el análisis de las dosis más habituales utilizadas en los diferentes países, con el estudio de las variables farmacocinéticas y de los datos farmacodinámicos de pacientes, y de modelos experimentales de infección²³. Se define cuál es el parámetro más útil para predecir la respuesta al tratamiento (área bajo la curva/CMI, concentración máxima/CMI, etc.). Tras ello se hacen análisis de probabilidad, como la simulación de Monte Carlo, para comprobar que los datos farmacodinámicos se ajustan a un modelo predecible y útil para otros grupos poblacionales. Por último se analizan los datos de infecciones fúngicas en pacientes de los que se dispone de datos clínicos y cepas identificadas a nivel de especie, y con estudio de sensibilidad. Si se encuentra correlación entre la respuesta clínica y los datos farmacodinámicos, se establece un punto de corte clínico. Si no es así, se recomienda emplear el ECOFF para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad, hasta que se disponga de los estudios necesarios para establecer los puntos de corte clínicos^{14,24-26}.

Basándose en estos criterios, el EUCAST ha establecido puntos de corte de anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, voriconazol y posaconazol para las pruebas de sensibilidad con *Candida*^{4,15,16}. El CLSI ha definido puntos de corte para las equinocandinas y los azoles, e incluso ha modificado parte de los puntos de corte que había establecido en 1997¹⁷⁻¹⁹. Uno de los puntos más destacables es la modificación reciente de los puntos de corte de fluconazol del CLSI. Este comité ha revaluado la información disponible y ha decidido descender los valores de sus puntos de corte de fluconazol para la mayor parte de las especies de *Candida*. Estos puntos de corte coinciden con los establecidos por el EUCAST, lo que ha significado un paso definitivo en la armonización de ambos procedimientos de referencia (tabla 2).

Métodos comerciales

Varias técnicas comerciales como el Etest® (AB Biodisk), Sensititre YeastOne® (Trek Diagnostic Systems Ltd.), Fungitest® (Bio-Rad), Vitek 2® (bioMérieux) se han implantado en muchos laboratorios clínicos para realizar los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. De todos ellos hay estudios de validación clínica y análisis de correlación con los procedimientos de referencia²⁷⁻²⁹. Su principal utilidad es la detección de la resistencia a fluconazol, que sigue siendo el principal

problema clínico de la resistencia antimicrobiana en el campo de la micología médica. También parecen fiables para detectar la resistencia a equinocandinas, aunque hay menos estudios que analicen este aspecto, ya que los puntos de corte a equinocandinas se están estableciendo por parte del EUCAST y se han revisado recientemente por el CLSI.

Estas técnicas son más prácticas y fáciles de mantener por parte de los laboratorios clínicos. Están basadas en la difusión en agar o en la microdilución marcada con contrastes para facilitar la lectura. Su precio, en términos generales, es inferior o similar al de las técnicas de referencia, por lo que es comprensible que se hayan impuesto en los laboratorios asistenciales, principalmente para conocer la sensibilidad a fluconazol en las cepas clínicas⁵.

Uno de los puntos más controvertidos acerca de las técnicas comerciales es si pueden emplearse los puntos de corte de los procedimientos de referencia para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad obtenidos por métodos comerciales. Hay expertos que creen que sí, ya que los resultados de los métodos de referencia y de los comerciales son comparables. Pero las recomendaciones del CLSI y del EUCAST son que se establezcan puntos de corte propios para estas técnicas. El procedimiento para establecer puntos de corte se basa en el análisis poblacional de los valores de la CMI para cada especie y para cada antifúngico, por lo que se debería realizar el mismo análisis con las CMI obtenidas con los métodos comerciales y no usar criterios de interpretación establecidos con valores obtenidos con otros procedimientos, ya que puede haber variaciones en los valores de las CMI dependientes de la técnica empleada⁶.

Otro aspecto interesante es qué papel van a jugar en el futuro las técnicas de referencia basadas en la microdilución si los métodos comerciales se están imponiendo en los laboratorios asistenciales (tabla 3)⁵. En primer lugar, como ya se indicó previamente, las técnicas de referencia deben utilizarse para confirmar la resistencia a los antifúngicos detectada por un método comercial. Además deben seguir empleándose para establecer los puntos de corte pendientes. Son las únicas que tienen un procedimiento estandarizado y completamente reproducible, de ahí que sean más complejas que las técnicas comerciales a la hora de realizarlas. Además deben emplearse en los procesos de revisión y actualización de los puntos de corte, que se realizan periódicamente según aumentan el número de casos tratados con antifúngicos y los estudios farmacodinámicos.

Los métodos de referencia también deben emplearse para validar y analizar la fiabilidad de las nuevas técnicas de sensibilidad que están desarrollándose. Los avances tecnológicos van a permitir diseñar métodos basados en la detección de componentes fúngicos (antígenos, ADN, etc.) y en recuentos de células (citometría, calorimetría, etc.), que podrían utilizarse para determinar la sensibilidad in vitro de los microorganismos. Estos métodos tienen que compararse con los procedimientos de referencia antes de su aplicación en los laboratorios clínicos²⁷.

La actividad in vitro de nuevos antifúngicos también debe evaluarse mediante los procedimientos de referencia. Estos ofrecen un estándar que puede aplicarse para conocer el espectro de actividad

Tabla 2
Puntos de corte clínicos aprobados por el EUCAST y el CLSI para interpretar los estudios de sensibilidad con *Candida* (datos en mg/l)

Antifúngico	Especies	EUCAST			CLSI			
		Susceptible	Intermedio	Resistente	Susceptible	S-DD	Intermedio	Resistente
Itraconazol	<i>C. albicans</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	0,25-0,50	-	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	0,25-0,50	-	≥ 1
	<i>C. krusei</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	0,25-0,50	-	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	0,25-0,50	-	≥ 1
	<i>C. tropicalis</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	0,25-0,50	-	≥ 1
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	> 4	≤ 2	4	-	≥ 8
	<i>C. glabrata</i>	IE	IE	IE	-	≤ 32	-	≥ 64
	<i>C. krusei</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	> 4	≤ 2	4	-	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	> 4	≤ 2	4	-	≥ 8
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 0,125	-	> 0,125	≤ 0,12	-	0,25-0,50	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
	<i>C. krusei</i>	IE	IE	IE	≤ 0,50	IE	1	≥ 2
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 0,125	-	> 0,125	≤ 0,12	-	0,25-0,50	≥ 1
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,125	-	> 0,125	≤ 0,12	-	0,25-0,50	≥ 1
Posaconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	SE	SE	SE	SE
	<i>C. glabrata</i>	IE	IE	IE	SE	SE	SE	SE
	<i>C. krusei</i>	IE	IE	IE	SE	SE	SE	SE
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	SE	SE	SE	SE
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	SE	SE	SE	SE
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	≤ 1	-	> 1	SE	SE	SE	SE
	<i>C. glabrata</i>	≤ 1	-	> 1	SE	SE	SE	SE
	<i>C. krusei</i>	≤ 1	-	> 1	SE	SE	SE	SE
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 1	-	> 1	SE	SE	SE	SE
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 1	-	> 1	SE	SE	SE	SE
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	SE	SE	SE	≤ 0,12	-	0,25	≥ 0,50
	<i>C. krusei</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	SE	SE	SE	≤ 2	-	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
Micafungina	<i>C. albicans</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	SE	SE	SE	≤ 0,06	-	0,12	≥ 0,25
	<i>C. krusei</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	SE	SE	SE	≤ 2	-	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	SE	SE	SE	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
Anidulafungina	<i>C. albicans</i>	≤ 0,03	-	> 0,03	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	≤ 0,12	-	0,25	≥ 0,50
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	NR*	NR*	NR*	≤ 2	-	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,06	-	> 0,06	≤ 0,25	-	0,5	≥ 1

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; IE: sin evidencias para establecer un punto de corte; NR: no se recomienda realizar estudio de sensibilidad pues la especie parece ser resistente in vitro; SE: los puntos de corte se encuentran en proceso de definición; S-DD: susceptible dependiente de la dosis.

*En el caso de las equinocandinas y *Candida parapsilosis*, la recomendación se encuentra en discusión.

de las nuevas moléculas. En este sentido, algunos expertos recomiendan que las agencias e instituciones encargadas de aprobar el uso clínico de nuevos antimicrobianos incluyan, entre los requerimientos necesarios, ejercicios para establecer puntos de corte y que el nuevo fármaco se comercialice con criterios para interpretar los resultados

de los estudios de sensibilidad ya establecidos, y que no se determinen tras su utilización en clínica como viene ocurriendo hasta ahora^{5,6}.

Por último, los procedimientos de referencia deben emplearse para realizar estudios periódicos de vigilancia epidemiológica^{30,31}. Es-

Tabla 3

Indicaciones actuales de los procedimientos de referencia para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos

Indicaciones de los métodos de referencia
1. Desarrollo de puntos de corte
2. Confirmar la resistencia in vitro detectada con métodos comerciales o técnicas de <i>screening</i>
3. Vigilancia epidemiológica periódica para detectar la aparición de resistencias
4. Ser el estándar con el que nuevas técnicas de sensibilidad se comparan y validan
5. Evaluación del espectro de actividad de nuevos antifúngicos
6. Estudios de sensibilidad en las especies fúngicas poco frecuentes en la práctica clínica

tos se realizan para conocer la distribución de especies en cada zona geográfica así como el porcentaje de resistencias a los antifúngicos en cada lugar, de forma que puedan realizarse las recomendaciones adecuadas para los tratamientos de primera línea y en caso de terapia empírica. La periodicidad es fundamental para conocer la emergencia de cepas resistentes y de nuevas especies cuyo perfil de sensibilidad sea poco conocido. En estos casos se debe realizar el estudio de sensibilidad por un procedimiento de referencia, tanto para confirmar la resistencia in vitro como para conocer la sensibilidad de las especies poco frecuentes, para las que las técnicas comerciales no se han validado, sobre todo en las de crecimiento lento o que necesitan de condiciones especiales para su cultivo.

Indicaciones de los estudios de sensibilidad

Varias sociedades científicas han publicado recientemente sus recomendaciones para realizar estudios de sensibilidad en levaduras^{6,7,32}. Todas coinciden en señalar la necesidad de realizar programas periódicos de vigilancia epidemiológica, como se ha señalado en el apartado precedente. Las conclusiones de estos programas ayudan a actualizar las guías terapéuticas de cada área geográfica, recogiendo los tratamientos más adecuados según la epidemiología local.

Por otra parte, hay algunas diferencias de criterio en lo que se refiere a la utilidad de los estudios de sensibilidad para el manejo individual de los pacientes. Las recomendaciones de la ESCMID aconsejan realizar estudios de sensibilidad en todas las cepas de levaduras aisladas de muestras profundas, ya que la información que se obtiene es de gran valor para el manejo del paciente. En cuanto al método a utilizar, se recomiendan métodos comerciales validados o los procedimientos de referencia. Asimismo se hace hincapié en algunos casos, en los que los resultados de las pruebas de sensibilidad son de especial importancia, como en pacientes con antecedentes de tratamientos antifúngicos y en los casos en los que se haya producido un fracaso terapéutico.

Conclusiones

Los procedimientos de referencia para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos en levaduras se han estandarizado y normalizado completamente en los últimos años. Los estándares incluyen normas para asegurar la calidad de los resultados.

Además hay un procedimiento para establecer puntos de corte que se está empleando con éxito para definir criterios que sirvan para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad. El compromiso de los comités internacionales (EUCAST y CLSI) en establecer puntos de corte para todos los antifúngicos con indicaciones en el tratamiento de las infecciones fúngicas invasivas.

Los métodos comerciales con validación clínica se han implantado en los laboratorios asistenciales. Se recomienda confirmar las res-

sistencias in vitro detectadas por estas técnicas mediante un procedimiento de referencia.

Las pruebas de sensibilidad deberían realizarse en todas las cepas aisladas de infecciones fúngicas invasivas, siendo de especial relevancia clínica en pacientes con antecedentes de terapia antifúngica previa y en los fracasos terapéuticos.

Agradecimientos

Ana Alastruey-Izquierdo tiene un contrato de investigación asociado a la REIPI (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Project MPY 1022/07_1) y del Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E246-7.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
- Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat.* 2010;13:180-95.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C. EUCAST breakpoints for antifungals. *Drug News Perspect.* 2010;23:93-7.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8:267-76.
- Cuenca-Estrella M. Laboratory diagnosis of fungal infection diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:257-64.
- Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindos G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:39.e1-15.
- Alastruey-Izquierdo A, Gómez-López A, Arendrup MC, Lass-Flörl C, Hope WW, Perlin DS, et al. Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST methodology. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2509-12.
- Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-López A, Bernal-Martínez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1563-70.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
- Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Pfaller MA, Rinaldi 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.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. 2nd ed. M44A2. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2009.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7 Suppl 2:46-53.
- Rodríguez-Tudela JL, Almirante B, Rodríguez-Pardo D, Laguna F, Donnelly JP, Mouton JW, et al. Correlation of the MIC and dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3599-604.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W, Lass-Flörl C, Rodríguez-Tudela JL. EUCAST technical note on posaconazole. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:E16-7.
- Arendrup MC, Rodríguez-Tudela JL, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W. EUCAST technical note on anidulafungin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:E18-20.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive Breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:435-47.

18. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011;14:164-76.
19. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:330-43.
20. Arendrup MC, García-Effron G, Lass-Flörl C, López AG, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:426-39.
21. Arendrup MC, Rodríguez-Tudela JL, Park S, García-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: analysis of the influence of bovine serum albumin supplementation, storage time, and drug lots. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1580-7.
22. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:3107-13.
23. Jeans AR, Howard SJ, Al-Nakeeb Z, Goodwin J, Gregson L, Majithiya JB, et al. Pharmacodynamics of voriconazole in a dynamic in vitro model of invasive pulmonary aspergillosis: implications for in vitro susceptibility breakpoints. *J Infect Dis.* 2012;206:442-52.
24. Cuesta I, Bielza C, Larranaga P, Cuenca-Estrella M, Laguna F, Rodríguez-Pardo D, et al. Data mining validation of fluconazole breakpoints established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2949-54.
25. Cuesta I, Bielza C, Cuenca-Estrella M, Larrañaga P, Rodríguez-Tudela JL. Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and comparison with those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:1541-6.
26. Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, et al. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *J Clin Microbiol.* 2007;45:109-11.
27. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:486-92.
28. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1782-6.
29. Dannaoui E, Paugam A, Develoux M, Chochillon C, Matheron J, Detry A, et al. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clinical Microbiol Infect.* 2010;16:863-9.
30. Cuenca-Estrella M, Rodríguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, et al. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:194-9.
31. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:917-21.
32. Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:2801-16.