

Comparación de las tiras E-Test y MIC-E para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de “anfotericina b” y “fluconazol” en 30 cepas de levaduras del género Candida a partir de hemocultivos.

Paola Monserrat Hernández Cote



Tutores:

Interno. M. en C. Rubén del Muro Delgado

Externo. M. en AOS. Ma. Del Rosario Vázquez Larios

“Reporte de Servicio Social”

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Ciudad de México 2019

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido

1. Introducción
 - 1.1 Justificación
2. Marco teórico
 - 2.1 Hemocultivos
 - 2.2 Levaduras
 - 2.3 Candida
 - 2.4 Candidosis
 - 2.5 Antimicóticos
 - 2.6 Perfil de susceptibilidad
 - 2.7 Epsilometría
3. Marco metodológico
 - 3.1 Objetivo general
 - 3.2 Objetivos específicos
 - 3.3 Equipos e insumos
 - 3.3.1 Equipos
 - 3.3.2 Materiales
 - 3.3.3 Reactivos
 - 3.3.4 Medios de cultivo
 - 3.3.5 Antimicóticos en tiras de epsilometría
 - 3.3.6 Microorganismos
 - 3.4 Procedimientos
 - 3.4.1 Panorama general
 - 3.4.2 Recuperación de cepas
 - 3.4.3 Preparación de medio RPMI
 - 3.4.4 Identificación
 - 3.4.5 Susceptibilidad
4. Resultados
5. Conclusión
6. Referencias
7. Anexo 1 Ejemplo de placas con tiras de MIC-E aplicadas
8. Anexo 2 Tabla de susceptibilidad de levaduras del género *Candida* spp.

Introducción

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas son consideradas un suceso creciente y de preocupación a nivel mundial.

Las infecciones del género *Candida* son las de mayor importancia por ser oportunistas, cuyos organismos se reproducen por formación de *blastosporas*, a partir de *pseudomicelios* o bien por *micelios* verdaderos. Las enfermedades ocasionadas por este género son conocidas como “candidosis”. El espectro clínico de las infecciones ocasionadas por *Candida* es muy amplio, desde infecciones cutáneas leves hasta candidosis sistémicas muy severas en pacientes críticos, situación que da lugar a una elevada mortalidad (Magariños y Rodríguez, 2012).

Cabe mencionar, que el aumento significativo de las infecciones profundas por levaduras se debe a causas iatrogénicas. El uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, la implantación de material protésico, el implante de órganos, la prematuridad y, en general, cualquier tipo de inmunosupresión (terapéutica o adquirida), son la principal causa de candidosis (Pemán, s.f.).

A lo largo de los años se ha logrado desarrollar medicamentos antifúngicos para tratar estas infecciones, desde tópicos hasta sistémicos. Posterior a la introducción de los antifúngicos, una parte del problema estaba resuelta, el tratamiento y la eliminación de los síntomas provocados por levaduras; sin embargo, la administración indiscriminada de estos medicamentos ocasionó la alteración de la sensibilidad y aparición de nuevas variantes de especies del mismo género (Nucci et.al., 2010).

Fue hasta 1983, cuando el impacto de las infecciones fúngicas en enfermos con SIDA o inmunodeprimidos y la aparición de las primeras resistencias a los azoles, que ganó relevancia e indujo la aplicación de métodos estandarizados que eran poco reproducibles e inconsistentes (Gómez, 2010).

La macrodilución y microdilución son técnicas de referencia que presentan cierta complejidad en la práctica diaria, dado el problema con la candidosis, se han desarrollado diferentes técnicas alternativas ya comercializadas. Una de esas alternativas y en las que se enfoca este reporte, es el método de epsilometría, en la que se ensayan las tiras E-Test, siendo tiras plastificadas sólidas de un material inerte impregnado con un gradiente exponencial continua (Biomérieux®, s.f.), y MIC-E, que son tiras de papel saturadas de un gradiente de concentración predefinida del antimicótico constituida por 15 diluciones (Liofilchem®, s.f.), de esta manera, se comparó la susceptibilidad entre las 30 cepas de levaduras del género *Candida* aisladas a partir de hemocultivos (Tapia, 2009).

Justificación

Es necesario que en los laboratorios de microbiología y micología se cuente con métodos confiables y sencillos para dar una adecuada susceptibilidad a los antifúngicos, de esta manera es posible brindar un mejor tratamiento al paciente con la claridad en los resultados de las muestras, por lo que es preciso definir el método de epsilometría que permite mayor confiabilidad.

Es por este motivo que se realizó este estudio con 30 cepas de levaduras del género *Candida* recolectadas de hemocultivos de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, con su debida identificación, recuperación, así como una comparación por el método de epsilometría, entre el uso de las tiras MIC-E y E-Test, que permite definir la correcta susceptibilidad de cada levadura.

Marco teórico

*Hemocultivo

Es una herramienta diagnóstica esencial que se realiza antes de la administración de la terapia, asimismo está indicada en niños pequeños o ancianos con disminución súbita de la vitalidad, ya que en estas poblaciones pueden no presentarse los signos y síntomas típicos de bacteriemias o fungemias.

Los frascos de hemocultivo contienen medio de cultivo (amplia variedad) y en algunas ocasiones tienen resinas que neutralizan los antimicrobianos cuando el paciente ya está recibiendo tratamiento, de igual manera, incluye un anticoagulante (SPS, polianetol sulfonato sódico) que inhibe la actividad bactericida del suero humano, que dificulta el crecimiento de algunos microorganismos. Cada frasco debe ser inoculado con un volumen no inferior de 10mL, siendo ideal realizar tres extracciones seriadas para minimizar las fungemias intermitentes, garantizando un rendimiento adecuado en la técnica (Fernández et al, s.f.).

*Levaduras

Son hongos unicelulares que se alimentan de azúcares y compuestos hidrogenados a través de las enzimas que producen. Estas enzimas fermentan los azúcares transformándolos en gas carbónico y alcohol. Son abundantes en la naturaleza, y se encuentran en el suelo y sobre las plantas.

Sus características generales son:

- La mayoría de las levaduras son hongos unicelulares sencillos microscópicos.

- La mayoría se reproduce asexualmente por gemación, y otras especies por fisión múltiple.

-Las levaduras que se reproducen sexualmente se conocen como “verdaderas”, que implica la formación de ascosporas, por ende, su clasificación es de “Ascomicetos”.

-Las levaduras “falsas” no producen ascosporas, pertenecen a los hongos imperfectos.

**Candida*

Son levaduras pertenecientes al *Phylum Ascomycotina*. Muchas especies han sido aisladas de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y mucosas de mamíferos. (Castañón, 2016)

El género *Candida* se identifica como levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2-6*3-9 μm , que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas (Vázquez & Sobel, 2011).

Existen aproximadamente 150 especies identificadas, el 90% de las infecciones son atribuibles a más de 17 especies patógenas, entre ellas: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Vázquez & Sobel, 2011).

Las levaduras del género *Candida* son integrantes de la biota corporal humana, su homeostasis es compleja y depende de muchos factores; entre ellos, la inmunidad mediada por células ya que desempeña un papel destacado por la asociación “linfocitos CD4-macrófago” para ejercer poder de vigilancia y su déficit resulta en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones depende, sobre todo, del nivel de células CD4 en sangre. Las candidiasis son evidentes en enfermos con recuentos inferiores a 400 linfocitos CD4/ μl . Debe tenerse en cuenta que las mananas y las mananoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de las CD4 (Castañón, 2016).

*Candidosis

Es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, que puede afectar cualquier tejido y presentar diferentes cuadros clínicos, asociados al estado inmunológico del paciente.

Las candidosis más frecuentes son las superficiales, que son de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, relacionadas con alteraciones en la hidratación y cambios de pH de la piel, boca, faringe y otros tejidos superficiales. Mientras que las sistémicas son generalmente severas y están relacionadas con la deficiencia del sistema inmune del paciente quien la padece, además de otros factores predisponentes relacionados, como: catéteres venosos colocados por

tiempo prolongado, catéteres centrales, neutropenia y administración de antibióticos, entre otros (Castañón, 2016).

***Antimicóticos**

El desarrollo de los antimicóticos o antifúngicos datan de 1900 con la aplicación de yoduro potásico en *esporotricosis*. Entre 1940 y 1950 surge el tratamiento tópico con un débil poder antifúngico. Fue hasta la década de los 90's cuando se incorporaron los triazoles, siendo el Itraconazol el primer antifúngico administrado por vía oral con un amplio espectro. En los años siguientes, se impulsó la creación de antifúngicos (ver tabla 1) con diferentes aplicaciones y mecanismos de acción (Allevato et.al., s.f.).

Tabla 1. Clasificación de los antimicóticos

Estructura	Sitio de acción	Antimicóticos	Utilidad clínica
Polienos	Membrana citoplasmática	*Nistatina *Natamicina *Anfotericina B	+Se usa en afecciones micóticas que amenazan la vida, a menudo es el tratamiento inicial, importante para pacientes inmunocomprometidos. +Una vez obtenida la respuesta clínica inicial, se continúa el tratamiento con el grupo azol.
Azoles	Membrana citoplasmática	*Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol *Triazoles: fluconazol, itraconazol. *Triazoles 2da generación: voriconazol, posaconazol y ravuconazol.	+Se usa en patologías locales y sistémicas, siendo efectivo en candidosis de la mucosa. Se puede administrar por vía oral o parenteral, dependiendo del grado de compromiso de la infección.
Alilaminas	Membrana citoplasmática	*Terbinafina *Naftifina	+Se usa de manera tópica, principalmente, en dermatomicosis preferencialmente onicomycosis. +Es fungicida.
Lipopéptidos	Pared celular	*Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina y micafungina.	+Usado para el tratamiento de neutropenia febril y como rescate para el tratamiento de aspergilosis invasiva. +También es utilizado en la profilaxis contra las infecciones por <i>Candida</i> .

Los antimicóticos que actúan en la membrana plasmática inhiben la síntesis de ergosterol, componente lipídico que permite el crecimiento y división celular de la célula, o se fijan al mismo modificando la permeabilidad de la membrana plasmática. Entre estos antimicóticos se encuentra la Anfotericina B, polieno que altera la permeabilidad de la membrana lo que permite la pérdida de proteínas, glúcidos y cationes, dando como resultado la muerte celular. Puede ser fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo.

Otro tipo de antimicótico que actúa a nivel de membrana plasmática es el Fluconazol, triazol con actividad fungistática por inhibición de la *demetilación* del lanosterol, esteroles necesarios para la integridad de la membrana, tanto *C. glabrata* y *C. krusei*, presentan resistencia a este antimicótico. Los triazoles se sintetizaron con un nitrógeno (N) más al anillo, para ampliar el espectro y disminuir la actividad contra las células humanas (Gómez, 2010).

*Perfil de susceptibilidad.

Para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluconazol en los estudios de sensibilidad de levaduras, el CLSI propone puntos de corte de ≤ 8 mg/L para las cepas sensibles, 16-32 mg/L para las cepas dosis dependientes y ≥ 64 mg/L para las cepas resistentes (Wayne, 2008).

Recientemente, Pfaller y colaboradores (Pfaller et al., 2010) tomando en cuenta los mecanismos de resistencia a fluconazol y la resistencia cruzada con otros azoles, así como los puntos de corte del CLSI y del EUCAST, los perfiles epidemiológicos de distribución de las CMIs y la correlación clínica sugieren una modificación de los puntos de corte para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, más en concordancia con los establecidos por el EUCAST (Sanabria et al., 2014). Los puntos de corte propuestos para el fluconazol frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis* son ≤ 2 mg/L para las cepas sensibles, 4 mg/L para las cepas dosis dependientes, y ≥ 8 mg/L para las cepas resistentes, con respecto a *C. glabrata* ≤ 32 mg/L para las cepas sensible dosis dependientes y ≥ 64 mg/L para las cepas resistentes (Pfaller et al., 2012)

*Epsilometría

Es una prueba de laboratorio usada por los microbiólogos para determinar si una cepa determinada de una bacteria u hongo es susceptible a la acción de antibióticos o antimicóticos específicos.

La epsilometría es un método que combina los principios de la difusión en disco y la dilución en agar en el estudio de la susceptibilidad *in vitro*. Este método es posible utilizarlo para gran cantidad de microorganismos, incluyendo los fastidiosos y los anaerobios (Triantafilo, s.f.).

A diferencia de la prueba de difusión en disco, la epsilometría es simple y fácil de usar entregando resultados cuantitativos, sin embargo, esta prueba debe realizarse

bajo condiciones rigurosamente controladas y estandarizadas aplicando las recomendaciones publicadas en las últimas guías de CLSI (Triantafilo, s.f.).

Para realizar el método epsilométrico se hace uso de una tira rectangular de un material inerte, esta tira está impregnada de un gradiente exponencial continuo del antimicótico o antibiótico problema en la cara inferior, y una escala de lectura en la cara superior. Las gamas de concentración que contienen las tiras corresponden al CMI (concentración mínima inhibitoria) clínicamente relevantes y puntos seleccionados para la clasificación de grupos de susceptibilidad (Triantafilo, s.f.).

Las tiras deben colocarse sobre una placa inoculada y luego del período de incubación requerido, es posible observar una elipse cuyo borde intersecta longitudinalmente la tira donde la concentración específica del antimicótico causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Las tiras con mayor comercialización son E-Test (Biomérieux®) y MIC-E (Liofilchem®), al tener la misma finalidad era necesario realizar una comparación (Tabla 2) para ayudar al microbiólogo a elegir una tira para tener una susceptibilidad adecuada.

Tabla 2. Comparación de las tiras más comercializadas.

E-Test (bioMérieux®)	MIC-E (Liofilchem®)
Posición como líder de confianza en el mercado.	
Tira plástica.	Tiras de papel especial de alta calidad
Alto nivel de precisión al cual no pueden llegar métodos automatizados.	Muestran precisión en los antibiogramas.
El paquete puede contener 1 o hasta 10 tiras.	El paquete puede contener 1 o hasta 10 tiras.
Amplia gama de más de 100 referencias antimicrobianas disponibles.	Disponibles para gran variedad de antimicrobianos.
Gradiente de concentración microbiana estable con una prolongada vida útil de hasta 5 años.	
Aporta datos de susceptibilidad de los organismos más exigentes.	

Marco metodológico

Objetivo general

Comparar por el método de epsilometría la susceptibilidad de los antifúngicos “Fluconazol” y “Anfotericina B”, por medio de tiras E-Test y MIC-E en 30 cepas de levaduras del género *Candida* aisladas de hemocultivos.

Objetivos específicos

- *Recuperar las cepas del género *Candida*, que han sido aisladas de hemocultivos.
- *Preparar los medios necesarios para cultivar y ensayar las pruebas de susceptibilidad.
- *Comparar los resultados obtenidos para la susceptibilidad antifúngica.

Equipos e insumos

1. Equipos

- *Ultracongelador (Forma *scientific*, modelo 926, -86°C freezer, non CFC *refrigerants*)
- *Incubadora CO₂ (*Thermo scientific*, modelo 3110, Series II Water Jacket CO₂ incubator)
- *Incubadora 35 ± 1 °C (HERAEUS, modelo B5090E)
- *Balanza analítica de un plato (*Muettler* AE 260, Dalta Range®)
- *Autoclave de vapor (STERIS, Amsco Century, modelo V116, *Prevac Steam Sterilizer*)
- *Potenciómetro (*Conductronic* PH140) con soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10 (J.T. Baker)
- *Refrigerador (*Thermo*, modelo SM, *electro corporation*)
- *Densitómetro McFarland (BEN 1B, bioSan, versión V.1AW)
- *Maldi-Toff (Bruker, microflex, BD)

2. Materiales

*Matraces	*Vasos de precipitado	*Probetas
*Charola de inoxidable	*Guantes de asbesto	*Mechero de Bunsen
*Filtradores manuales (Corning®)	*Cajas petri chicas (100*15mm/Labcraft®)	*Jeringas de 20 mL (BD Plastipak) sin aguja
*Tiras MIC-E (Liolfichem®)	*Tiras E-Test (Biomériux®)	

3. Reactivos

- *Etanol (BD Difco™)
- *Solución salina (BD Difco™)
- *Agua bidestilada (Argentopura®)
- *NaOH (J.T. Baker)

4. Medios de cultivo

* Caldo triptecaseína (BD Difco™)

* Agar sangre (BD BBL)

* Chromoagar Candida (BD BBL)

* Agar RPMI(SIGMA®) con 2% de glucosa y 0.165M de MOPS

5. Antimicóticos en tiras de epsilometría

* Fluconazol

* Anfotericina B

6. Microorganismos

* 30 cepas de levaduras del género *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Procedimientos

* Panorama general.

Recuperación de cepas

Preparación de medio de cultivo

Identificación

Susceptibilidad

*Recuperación de cepas

1. Sacar las cepas a estudiar del ultracongelador.
2. Descongelar las cepas a temperatura ambiente.
3. Con una torunda o hisopo humedecido con etanol, limpiar un extremo de la bolsa donde se encuentra la cepa.
4. Se esterilizan las pinzas y tijeras con etanol, para posteriormente cortar un extremo de la bolsa.
5. Con las pinzas se toma el papel filtro, que contiene la cepa, y se deposita en la placa de agar sangre.
6. Con ayuda del asa bacteriológica, se quita el excedente de la cepa del papel filtro esparciéndolo en la misma zona de la placa.
7. Con las pinzas se retira el papel filtro y se coloca en un tubo que contiene el medio de caldo de triptecaseína.
8. En la placa de agar sangre se estría de forma cruzada la muestra.
9. A continuación, se deja incubar por 48 horas en CO₂.

En caso de que la muestra este contaminada, se aísla en placa de chromoagar, para así asegurarse de que la muestra en la que se trabaje sea una levadura.

*Preparación del medio RPMI (1L)

1. En un matraz de 2L, colocar 15g de agar bacteriológico + 20g de glucosa, se adiciona 650mL de agua bidestilada y homogenizar con ayuda de calor.
2. Tras ebullición, se coloca un tapón de gasa y papel destreza en la boca del matraz, para, posteriormente, esterilizar en la autoclave por 15 minutos a 121.5°C.
3. Mientras el medio se esteriliza, en un vaso de precipitado depositar 8.4g de medio RPMI + 34053g de MOPS, adicionando 200mL de agua bidestilada.
4. Se homogeniza y con ayuda del potenciómetro, se lleva a un pH de 7. A continuación se afora a la cantidad de 350mL, manteniendo el pH de 7.
5. Adicionar por filtración la solución de RPMI+MOPS al medio de cultivo ya estéril.
6. Se homogenizan ambas soluciones y se vierten en las placas Petri, dejándolas enfriar. Subsiguientemente, el 10% de las placas realizadas entran a prueba de esterilidad y el resto se refrigera hasta su uso.

La prueba de esterilidad que se lleva acabo para las placas recién elaboradas, es incubarlas por 24 horas a temperatura ambiente, para observar si hay presencia o ausencia de microorganismos.

*Identificación

Tras recuperar la cepa y una vez pasado el tiempo de incubación en la placa de agar sangre...

1. El microorganismo puro se resiembra en una placa de Chromoagar Candida.
2. Se deja incubar a 35°C por 48 horas, y por medio del color expresado, identificar la especie.
3. Realizar a su vez, la identificación por medio del equipo MALDI-TOFF.

*Susceptibilidad

1. A partir del cultivo puro de 48 horas en Chromoagar Candida, realizar una suspensión en solución salina a 0.5 McFarland.
2. Con un hisopo estéril, humedecer con la suspensión anterior e inocular en 3 direcciones las placas de RPMI.
3. Dejar reposar 15 minutos la placa con el inóculo para su buena absorción.
4. Una vez pasado el tiempo, inocular nuevamente y dejar reposar por 15 minutos más.
5. Colocar las tiras MIC-E o E-Test en la superficie de la placa (ver figura1) y presionarlas para que estén en contacto completo con la superficie del agar.

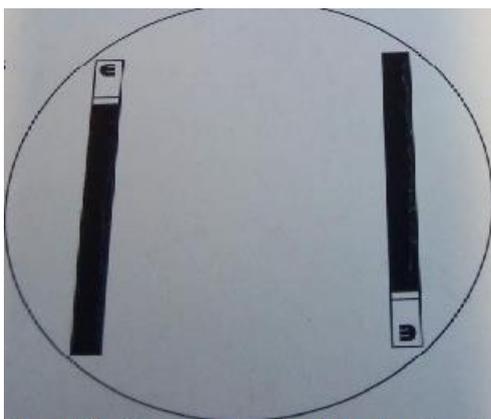


Figura 1. Plantilla para la colocación de tiras de epsilometría en placa de 90mm.

6. Incubar a 35±1°C durante 48 horas.
7. Realizar lectura e interpretación directa.
8. Interpretar con base a lineamientos de *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2017)-Anexo 2-

Resultados

Se utilizaron 30 cepas de levaduras del género *Candida* aislados de hemocultivos, observando el gráfico 1, la predominante fue *C. albicans*, seguido por *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* con el mismo porcentaje.

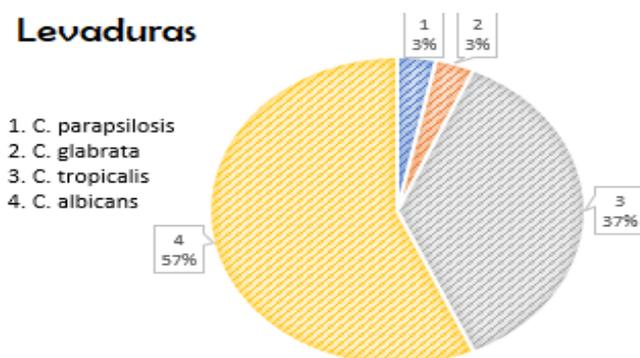
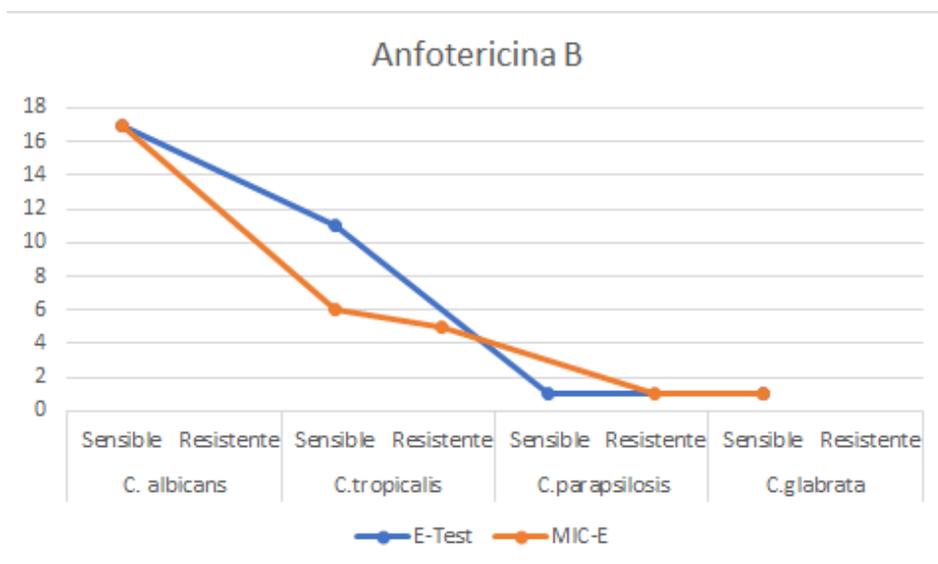


Gráfico 1. Frecuencia de levaduras aisladas de los 30 hemocultivos.

Al compararse 2 tipos de tiras para la concentración mínima inhibitoria, los resultados para el antimicótico "Anfotericina B" se observan en el gráfico 2 y en la tabla 3:



Gráfica 2. Comparación de las tiras E-Test y MIC-E para el antimicótico Anfotericina B.

Tabla 3. Clasificación de errores obtenidos por cada levadura según su susceptibilidad con el antimicótico anfotericina B.

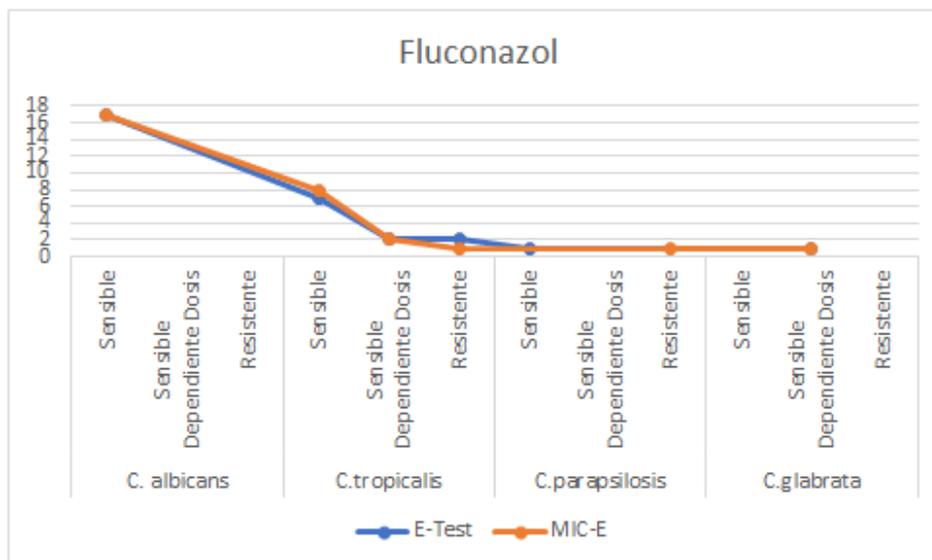
Anfotericina B								
Levadura	Sin error		Error menor		Error mayor		Error crítico	
	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E
C. albicans	17	17	-	-	-	-	-	-
C.tropicalis	11	6	-	-	-	5	-	-
C. parapsilosis	1	-	-	-	-	1	-	-
C. glabrata	1	1	-	-	-	-	-	-

Al analizar el gráfico 2, se puede apreciar que no hay gran diferencia entre una tira a otra, sin embargo, en el caso de *C. tropicalis*, en la tira de E-Test marca un 100% de sensibilidad para anfotericina, caso contrario con la tira MIC-E, arrojando un 54.54% de sensibles y un 45.45% de resistentes. Asimismo, en *C. parapsilosis* en E-Test da sensible y resistente para MIC-E.

Para verificar si los datos son significativos, debemos evaluar conforme la tabla 3, donde nos clasifica el número de levaduras con errores, es decir, las levaduras del género *Candida* son sensibles al antimicótico anfotericina B, al dar otro resultado y dependiendo de este, es un error menor, mayor o crítico.

Como se puede observar en la tabla 3, todas las levaduras analizadas con la tira de E-Test no presentan algún error al dar todas sensibles, en cambio, con las tiras de MIC-E para el caso de *C. tropicalis* con el 45.45% de las cepas y para *C. parapsilosis*, resulta con un error mayor.

En el caso del antimicótico “Fluconazol”, los resultados se muestran en el gráfico 3 y en la tabla 4:



Gráfica 3. Comparación de las tiras E-Test y MIC-E para el antimicótico Fluconazol.

Tabla 4. Clasificación de errores obtenidos por cada levadura según su susceptibilidad con el antimicótico Fluconazol.

	Fluconazol							
	Sin error		Error menor		Error mayor		Error crítico	
Levadura	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E	E-Test	MIC-E
C. albicans	17	17	-	-	-	-	-	-
C. tropicalis	7	8	2	2	2	1	-	-
C. parapsilosis	1	-	-	-	-	1	-	-
C. glabrata	1	1	-	-	-	-	-	-

En cuestión con el antimicótico fluconazol, las levaduras de género Candida presentan sensibilidad, con excepción de C. glabrata que presenta resistencia intrínseca.

Aunado a eso, al examinar el gráfico 3 las diferencias entre las tiras E-Test y MIC-E se muestran en C. tropicalis y C. parapsilosis. Para las tiras E-Test en C. tropicalis, el 63.6% de las cepas es sensible, un 18.1% de las cepas es sensible dependiendo de la dosis (SDD) y un 18.1% es resistente. Para las tiras MIC-E, un 72.7% de las cepas es sensible, el 18.1% es sensible dependiendo de la dosis (SDD) y el 9.09% de las cepas es resistente. Es decir, hay una discrepancia de 9% entre las tiras E-Test y MIC-E en C. tropicalis, a favor de MIC-E.

Para C. parapsilosis, la tira de E-Test da sensible mientras que la tira MIC-E es contrario, disponiendo a la cepa resistencia.

Al profundizar los datos con la tabla 4, se confirma la discrepancia entre ambas tiras en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. En las tiras E-Test para *C. tropicalis* el 63.6% no presenta ningún error, pero el 18.1% de las cepas tienen un error mayor al ser resistentes. Con las tiras MIC-E el 72.7% de las cepas no cuentan con ningún error, teniendo un 9% de cepas con error mayor, 9% menor con las tiras E-Test.

Al determinar la concentración mínima inhibitoria de las 30 cepas de levaduras, se apreciaron diferencias en el transcurso de la aplicación de la prueba:

*El medio de cultivo utilizado fue RPMI, se hizo uso de 2 marcas diferentes, una de ellas fue SIGMA® y otra fue Biowest®. En ambos casos, es necesario calentar el medio antes de verter en las placas para disminuir el uso de filtros, en el caso de la marca Biowest®, se generó gran cantidad de precipitado evitando la homogenización correcta del medio.

*Los problemas que se presentaron en el uso de las tiras fueron:

E-Test	MIC-E
*Es necesario tener práctica, ya que, al ser tiras plastificadas, se corre el riesgo de no separarlas adecuadamente, y colocar más de 1 tira.	*Las tiras son de papel y se usaron los paquetes con 10 piezas. Sin embargo, en algunas ocasiones se encontraban las tiras dobladas y mal cortadas.
	*Al estar dobladas y mal cortadas, no es posible asegurar la correcta dilución de la tira.

Conclusión

Tras el análisis de los resultados, se concluye que es preferible hacer manejo de las tiras E-Test para manifestar la concentración mínima inhibitoria, ya que no presentan problemas significativos, como las tiras MIC-E, y las concentraciones son las más viables para cada levadura que se ensayó.

Referencias

- Allevato, M. A., Negroni, R., y Galimberti R. (s.f.) Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. Buenos aires: Educación continua.
- Arredondo, J. L. & Amábile, C. F. (2010) *Susceptibility of Mexican isolates of yeasts and moulds to amphotericin B and triazole antifungals*. México: Instituto Nacional de Pediatría.
- Castañón L. R. (2016) Candidiasis o Candidosis. México: UNAM. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- CLSI (2017) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement*.
- Fernández, E.L., Planes, A. y Rodríguez, M. (s.f.) *Hemocultivos*. SEIMC.
- Gómez C. H. (2010) *Resistencia de levaduras del género Candida al fluconazol*. Colombia: Asociación Colombiana de Infectología.
- Liofilchem® (s.f.) MIC Test Strip. *Método cuantitativo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*.
- Magariños, M. M. y Rodríguez, C. (2012) *Candidiasis*.
- Nucci, M., Queiroz, T. F., Tobón, A., Restrepo, A. L. & Colombo, A. (2010). *Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America*. Clinical Infectious Diseases, 51(5), 561-570. Doi: 10.1086/655683
- Pemán, J. (s.f.) Papel del microbiólogo clínico en las candidiasis sistémicas. Valencia: SEIMC.
- Perozo, A., Calvo, B., Mesa, L. y Pineda, M. (2011) *Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol por el método de difusión, de cepas de Candida, aisladas de hemocultivos en Maracaibo, Venezuela*. Kasmera, 39(2), 114-122.
- Pfaller, MA., Andes, D., Diekema, D.J., Espinel-Ingroff, A. & Sheehan, D. (2010) *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, 13, 180-95.
- Pfaller, MA., Andes, D. & Diekema, DJ. (2012) *Progress in antifungal susceptibility testing of Candida spp by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods*. J. Clinical Microbiology, 50(9), 2846-56.
- Sanabria, R., Samudio, M., Fariña, N., Laspina, F., Figueredo, L., Aguilar, G., y Espínola, C. (2014) *Perfil de susceptibilidad a antifúngicos de aislados de Candida spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de corte para fluconazol*. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 12(1), 33-40.

- Tapia, C. V. (2009) Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144-150.
- Triantafilo, Vjera. (s.f.) *Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría)*. *Revista Chilena de Infectología*, 19(Supl.2), 85-87.
- Vazquez, J. A. & Sobel, J. D. (2011) *Candidiasis*. *Essentials of Clinical Mycology*, Chapter, 167-206. DOI: 10.1007/978-1-4419-6640-7_11
- Walker, A. L., Gow, N. A. & Munro, C. A. (2010). *Fungal echinocandin resistance*. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 117-126. Doi: 10.1016/j.fgb.2009.09.003
- Wayne, PA. (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A3*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 3° ed.
- Zaragoza, R. y Pemán, J. (2012) Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(2), 108–113.

Anexo 1. Ejemplo de placas con tiras de MIC-E aplicadas.

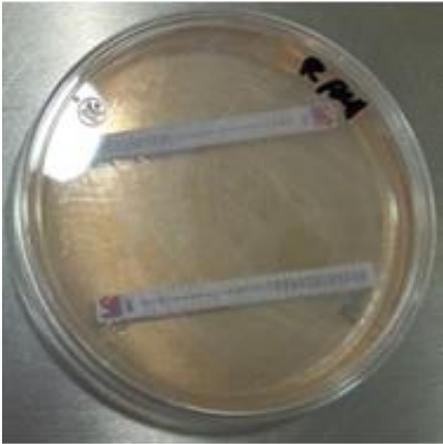


Fig. 1. Placa con tiras MIC-E recién inoculada.



Fig. 2. *C. parapsilosis* con tiras MIC-E de anfotericina B y fluconazol, dando resistencia.



Fig.3. Se observa el crecimiento de clones alrededor de las tiras.



Fig.4. Crecimiento de la levadura *C. albicans*, dando sensibilidad para ambos antimicóticos.

Anexo 2. Tabla de susceptibilidad de levaduras del género *Candida spp.*

Levadura	Anfotericina B			Fluconazol		
	S ≤	I	R >	S ≤	SDD	R ≥
<i>C. albicans</i>	1	-	1	2	4	8
<i>C. tropicalis</i>	1	-	1	2	4	8
<i>C. glabrata</i>	1	-	1	-	32	64
<i>C. krusei</i>	1	-	1	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1	-	1	2	4	8

Tabla 1. Puntos de corte según CLSI, 2017.