

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FUNGICA FRENTE A ANTIMICOTICOS.

Luis Zaror

Instituto de Microbiología Clínica,
Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.
Casilla 567. Valdivia, Chile.

Ana Espinel-Ingroff

Medical College of Virginia, Box 49, Virginia
Commonwealth University, Richmond, Virginia 23298, U.S.A

Palabras claves: Tablas de susceptibilidad fúngica.

Key words: Test of fungal susceptibility

RESUMEN

Se analizan las actuales pruebas de susceptibilidad fúngica frente a diversos antimicóticos.

SUMMARY

[Test of susceptibility against antimycotic drugs.]

Test of actual fungal susceptibility against antimycotic drugs are analysed.

Con la introducción de nuevos antifúngicos, el médico tratante tiene mejores opciones en el manejo de los pacientes con una micosis.

Las enfermedades producidas por hongos patógenos u oportunistas han aumentado en términos de morbilidad y mortalidad. Este incremento se debe, en parte, al uso de drogas citotóxicas, como también al de agentes antibacterianos más efectivos, a una terapia intensiva y quirúrgica más agresiva y el aumento de pacientes con SIDA u otras enfermedades de deficiencia del sistema inmunológico (3).

Normalmente, las pruebas de susceptibilidad de drogas antimicóticas para hongos no son muy usadas y no han sido estandarizadas (12). Sin embargo, debido a las comunicaciones de resistencia de levaduras incluyendo *Cryptococcus neoformans* (1), *Candida albicans* sobre el 50% del serotipo B frente a 5-fluorocitosina (5-FC), la rara ocurrencia de resistencia de las cepas de *Candida* a anfotericina B (14, 37), la frecuencia cada vez mayor de cepas de *Candida lusitanae* en pacientes con el sistema inmunológico comprometido (14), la producción de nuevas drogas como imidazoles (ketoconazol),

triazoles (fluconazol e itraconazol), los derivados de la alilamina (terbinafina) (32) y los lipopéptidos LY 121019 (Cilofungina) (7, 12), hacen que las pruebas de susceptibilidad para drogas antimicóticas sean necesarias (6).

Estas pruebas son especialmente más indispensables para drogas como la 5-FC, que para la anfotericina B. Se debe analizar todas las levaduras de pacientes que van a ser tratados con 5-FC y también las cepas aisladas durante el tratamiento (3). Son también importantes para los otros antimicóticos como el ketoconazol, itraconazol, fluconazol, cilofungina, entre otros. La actividad de esta última droga, por ejemplo, es específica para las cepas de *Candida* spp (5, 7, 12).

Hasta hoy día no existen antimicóticos aceptados por el tratamiento de las micosis por hongos dematiaceos o para la pseudo-allescheriosis.

Hay antimicóticos, como la griseofulvina, que actúan preferentemente sobre un determinado grupo de hongos filamentosos (dermatofitos) y no lo hacen sobre levaduriformes. Otros son de amplio espectro, como los imidazoles.

Es aceptado que la actividad inhibitoria observada "in vitro" es predictiva y se correlaciona bien

con el uso clínico de la sustancia probada. Esta presunción es válida para la mayoría de las drogas antibacterianas. Para algunos antifúngicos, especialmente los imidazoles N-sustituidos y derivados triazólicos, esta correlación es pobre, por lo que los test de susceptibilidad o de screening no se usan con ellos.

Las pruebas de susceptibilidad son esencialmente similares a las usadas en bacteriología y en la misma forma ayudan en la selección del mejor tratamiento de infecciones micóticas. También pueden explicar la razón del fracaso del tratamiento. Estas pruebas darán un resultado cuantitativo, la concentración inhibitoria mínima (CIM) o las CIMs y las concentraciones letales mínimas (CLM) que matan al hongo. Las CLMs son obtenidas cuando las pruebas son realizadas utilizando caldo como medio de cultivo en lugar de medios con agar.

Por las diferentes formas de los hongos (miceles y levaduriformes) y características de las drogas, deben considerarse una serie de factores en el estudio de las CIMs, de los cuales enunciaremos algunos (4, 15, 29, 35):

- a. Dimorfismo fúngico. Si la fase usada es la de levadura, se requiere incubación a 37°. La conversión de la fase vegetativa a la fase parasitaria (levadura) es a dicha temperatura, la que a veces es difícil y puede ser inconsistente (ej. *Histoplasma capsulatum*). Por lo general, las CIMs para estos hongos se determinan con la forma vegetativa.
- b. Niveles séricos o de penetración en la piel.
- c. Deterioro térmico por incubación (Polienos a 37°C).
- d. Fotolábiles. Los polienos son inactivados por la luz. También el bifonazol se deteriora por acción de ésta.
- e. Temperatura de incubación. Se acepta convencionalmente la temperatura de 30°C, aún cuando evidentemente, para hongos productores de micosis profundas será mejor estudiarlos a 37°C. Sin embargo, el subcomité del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) para estandarizar estas pruebas ha determinado que para las cepas de *Candida* spp. frente a 5-FC, ketoconazol y anfotericina B la temperatura a usar es de 35°C (26).
- f. Estabilidad de la droga. Si el antimicótico es estable pueden elaborarse discos de susceptibilidad para antifungigrama cualitativo. Estos discos se pueden adquirir en Europa, principalmente, pero estas pruebas tienen una aplicación limitada. El miconazol y otros antimicóticos pierden actividad al ser solubilizados (10).
- g. Medio de cultivo. No existe aún un medio de cultivo aceptado internacionalmente para el estudio de CIMs para hongos. Drouhet y Dupont (4) y Mallie y col. (21) obtuvieron CIMs distintas para los mismos hongos al usar diferentes medios de cultivo. En un estudio de CIMs cooperativo interlaboratorios, para levaduras, también fueron encontradas diferencias significativas entre los 5 participantes (11).
El comité del NCCLS está buscando aún el mejor medio para efectuar CIMs. Hasta la fecha, estudios preliminares han demostrado que el medio RPMI-1640 (Sigma), conteniendo buffer MOPS a una concentración de 0,165M y ajustado a un pH 7,0, dió resultados constantes en los 11 laboratorios incluidos en el estudio (26). Estos estudios se proseguirán por parte del NCCLS con el objetivo final de estandarizar la determinación de CIMs para hongos.
Para 5-FC no puede usarse caldo o agar Sabouraud, ya que esta droga que es un antimebolito competitivo de uracilo en la síntesis de RNA y que interfiere también con la timidilato sintetasa, puede ser antagonizada in vitro por bases púricas, pirimidicas y nucleósidos contenidos en los medios peptonados. Por eso deben usarse medios sintéticos libres de dichas sustancias como es el medio base de nitrógeno para levaduras (YNB). Las polioxinas no muestran efecto inhibitorio en medio Sabouraud glucosado o en caldo triptosa. En cambio hay inhibición en YNB o en medio base de Carbono-lisina para levadura (29).
El clotrimazol, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol, son antagonizados por medios ricos como el de Sabouraud y el caldo infusión cerebro corazón (BHI). El agar Kimmig (Merck), el medio sintético de aminoácidos para hongos (SAAMF, producido por American Biorganics, U.S.A.) y el medio para pruebas antimicóticas (H-R de Oxoid, Inglaterra), han sido recomendados para los azoles triazoles (9, 13, 22, 36).
El medio YNB no es satisfactorio para polienos por el bajo pH que presenta al acidificarse o asimilarse la glucosa (pH < 5,0). Shadomy y Espinel-Ingroff recomiendan el uso del medio para antibióticos # 3 FDA (29). Estos medios deben usarse sin el agregado de cicloheximida o de antibacterianos. Un resumen de los medios de cultivos recomendados se presentan en el Cuadro 1.
- h. Tamaño del Inóculo. La susceptibilidad del hongo en estudio es afectada por el tamaño del inóculo (39). Hoy se acepta, en general, un

inóculo de 10^4 - 10^6 células fúngicas (o propágulos) por ml. En algunos casos especiales se usan inóculos menores. Recientemente Plempe y col. (27) consideran como clínicamente relevante un inóculo de 10^3 - 10^4 UFC.

Cuatro métodos para la preparación de inóculos fueron evaluados en tres laboratorios simultáneamente (25). Los investigadores recomiendan el uso del método espectrofotométrico para preparar los inóculos que da menos variación. En los estudios efectuados recientemente por el NCCL, el inóculo recomendado es de 1.5×10^4 UFC. Densidades menores de 1.5×10^3 están siendo evaluadas.

Lo ideal sería que las etapas de la metodología CIMs estuviesen estandarizadas.

Preparación del inóculo de hongos filamentosos: Las cepas de hongos filamentosos son cultivados en agar Sabouraud dextrosado. A los 10-15 días de desarrollo a 28°C se cubre el cultivo con Tween 80 al 1% en agua destilada estéril para soltarlo y removerlo. Posteriormente se filtra la suspensión por gasa estéril de cuatro dobleces.

Preparación del inóculo de hongos levaduriformes: Se incuban las cepas después de sembradas en agar Sabouraud, a 28°C por 2-4 días (con excepción de la forma levaduriforme de los dimórficos). Una vez desarrolladas las cepas, removerlas con solución salina hasta turbidez uniforme.

CUADRO 1

Medios recomendados para CIMs según antimicótico a estudiar.

Antifúngico	Medio
5-Fluorocitosina	Medio base de nitrógeno para levaduras (YNB) tamponado con buffer MOPS (0,165M) (1) RPMI 1640 (Sigma) tamponado con buffer MOPS (0,165M).
Anfotericina B	M-20 M-3 (Difco, U.S.A.) RPMI 1640 Sigma, tamponado con buffer MOPS (0,165M).
Imidazoles	YNB tamponado con MOPS (0,165M). (2) Agar Kimmig (Merck, Alemania) (3) SAAMF (American Biogarnics, Inc. U.S.A.) (4) H-R (Oxoid, Inglaterra).
Griseofulvina	M-3
Tolnaftato y tolciclato de sodio	Sabouraud Agar Kimmig

- 1) RPMI 1640: Hasta el presente este medio ha sido estudiado solo con cepas de *C. albicans* para la 5-FC, anfotericina B y ketoconazol (26). El pH es ajustado a 7.0
- 2) Caldo Kimmig: Excluir el agar de la formulación.
- 3) Medio sintético de aminoácidos, para hongos. (Contiene buffer 0.165 M MOPS).
- 4) Medio para pruebas de antimicóticos.

En ambos casos ajustar la turbidez de la suspensión a una transmitancia de 75% leída a 530 nanómetros, la cual contiene aproximadamente 1.5×10^6 UFC/ml. Este método incluye sólo a ciertas levaduras. Otros hongos se pueden ajustar a distintas transmitancias (8). Al igual que en bacteriología es recomendable usar cepas estándares para el control de pruebas de susceptibilidad (Cuadro 5).

- i) **Influencia del solvente.** En general son insolubles en agua y deben usarse diversos solventes (Cuadro 2). En itraconazol solubilizado en alcohol de 50%, *Candida albicans* fue susceptible entre un 42,9-39,5% en medio Sabouraud y BHI. Las mismas cepas tratadas con itraconazol en DMSO fueron susceptibles entre el 99-70,6% respectivamente (37).
- j) **Tiempo de incubación.** Debe considerarse las características de desarrollo del hongo. Para los levaduriformes (excepto forma levaduriforme de hongos sistémicos) incubar 24-48 horas. En levaduras el mejor tiempo se logra a la 48 horas, pudiendo la composición del medio influir en los resultados. Estudios preliminares del NCCLS han encontrado que para 5-FC, ketoconazol y aún para anfotericina B, 24 horas de incubación dan resultados más uniformes para algunas levaduras (26). Para dermatofitos incubar por 7 días. Para hongos unicelulares de crecimiento rápido: 3-5 días. Sin embargo, lo mejor es leer las CIMs tan pronto como el tubo o placa control, sin droga, muestre crecimiento.
- k. **Fase de crecimiento (exponencial o estacionaria).** La cilofungina da mejores resultados en la fase exponencial.
- l. **Condiciones de oxígeno.** Las pruebas de CIMs para hongos se hacen en aerobiosis. El ketoconazol es inactivo contra levaduras en condiciones de anaerobiosis.
- m. **Sinergia antimicótica - antibacterianos.** Estudiar la sinergia de antimicóticos más antibacterianos, porque la anfotericina B es inherentemente tóxica y porque combinaciones pueden ser más eficaces que una sola droga (16, 19, 29, 30, 34)
- n. **Toxicidad.** La nistatina es muy tóxica como para ser usada por vía sistémica.
- ñ. **Vía de administración y excreción.**

- o. **Mecanismo de acción.** El Cuadro 3 muestra sinópticamente el sitio de acción de los antimicóticos más conocidos.

En las pruebas de susceptibilidad cualitativas (disco), se realiza la interpretación por lectura de los halos de inhibición en relación a CIM previamente establecidas. (Cuadro 4).

MÉTODOS DE SUSCEPTIBILIDAD USADOS EN MICOLOGIA.

Los métodos de estudios de susceptibilidad son básicamente los mismos usados en bacteriología, con las variaciones relacionadas con las características de los hongos y de las drogas antes mencionadas. Las pruebas de susceptibilidad se pueden efectuar en medios líquidos o sólidos y semisólidos (23). El método del disco (método cualitativo) es de uso aún limitado por problemas de reproducción de resultados, estabilidad de algunos antifúngicos y disponibilidad en el mercado. También se han implementado métodos automáticos (28).

Método en medio líquido. El medio de cultivo a usar dependerá de la droga en estudio (ver Cuadro 1). Es un método fácil de realizar que debe ser efectuado en duplicado y con tubos control sin antifúngico. La temperatura de incubación es por lo general de 30° C (vea información anterior) y el tiempo de incubación es de 24 horas a 7 días dependiendo de la velocidad de crecimiento del hongo en estudio.

Preparación del inóculo de hongos filamentosos: Las cepas de hongos filamentosos son cultivadas en agar Sabouraud dextrosado. A los 10-15 días de desarrollo a 28° C se cubre el cultivo con Tween 80 al 1% en agua destilada estéril para soltarlo y removerlo. Posteriormente se filtra la suspensión por gasa estéril de cuatro dobleces.

Preparación del inóculo de hongos levaduriformes: Se incuban las cepas después de sembradas en Agar Sabouraud, a 28° C por 2-4 días (con excepción de la forma levaduriforme de los dimórficos). Una vez desarrolladas las cepas, removerlas con solución salina hasta turbidez uniforme.

En ambos casos, ajustar la turbidez de la suspensión a una transmitancia de 75% leída a 530

CUADRO 2

Drogas antimicóticas, solventes y procesos de esterilización

ANTIFUNGICO	SOLVENTE	DILUYENTE	SOLUCION MADRE	ESTERILIZACION
Tolnaftato de sodio	DMSO			Auto-estéril
Tolciclato de sodio	Alcohol			Auto-estéril
Clotrimazol	Etanol 95%, PEG		10 mg/ml en DMSO.	Auto-estéril
Miconazol	DMSO		Almacenar a -30° C	Auto-estéril
	Alcohol 50%, PEG		hasta por un año.	Auto-estéril
Ketoconazol	HCl (0,2N)			Autoclave
	DMSO			
	Etanol 50%, PEG			
Itraconazol	Etanol 100% + 0,2N HCL			
Fluconazol	Agua destilada			
Oxiconazol	DMSO			
Bifonazol	DMSO, PEG, Metanol, Acetona			
Pimaricina				
Griseofluvina	DMSO			Auto-estéril
Natamicina	Agua destilada, Metanol			Auto-estéril
Metil ester. de Anfotericina B o de Nistatina	Agua			Filtración
Naftifina	DMSO			Auto-estéril
5-Fluorocitosina	Agua destilada o solución salina 0,85%			Por filtración
Anfotericina B (Nistatina)	DMSO, DMF			Auto-estéril
			10 mg/ml en agua. Almacenar a -20° C hasta por 6 meses.	Por filtración
			5 mg/ml en DMSO o DMF. Por filtración Almacenar en oscuridad a 4° C hasta por 1 semana.	Auto-estéril
			Preparar al momento de usar.	Por filtración

Solución salina 0,85% o el caldo en uso.

Solución salina 0,85% o el caldo en uso. Ajustar pH final a 9,0 con NaOH
Metanol
Sol. salina o caldo en uso

DMF: Dimetil formamida DMSO: Dimetil sulfoxido

nanómetros, la cual contiene aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/ml para ciertas levaduras. Otros hongos se pueden ajustar a distintas transmitancias (8). Al igual que en bacteriología es recomendable usar cepas estándares para el control de pruebas de susceptibilidad (Cuadro 5).

CIMs por el método de dilución en caldo. Colocar a cada tubo de la serie 1 ml de medio líquido, con excepción del tubo 1. Agregue 1 ml de la droga a estudiar a los tubos 1 y 2 a partir de una solución de trabajo conocida. Por lo general para 5-FC se incluyen de 10 a 12 tubos con diluciones de 100 o 64 ug/ml a 0,05 ug/ml. Para anfotericina B, se puede empezar con 4 ug/ml a 0,0625 ug/ml. Para ketoconazol de 4-0,0039 ug/ml. Mezcle bien el tubo 2 y de él tome 1 ml y páselo al tubo 3 y así sucesivamente hasta el penúltimo de la serie. El último tubo no lleva droga y sirve de control. En el Cuadro 6 se muestra un esquema tipo de dilución en caldo.

A la serie de tubos agregarle 1 ml de una suspensión estándar del hongo con una concentración de 10^5-10^6 unidades formadoras de colonias. (ver información anterior).

Se puede usar como control de la droga una cepa de CIM conocida, de referencia para pruebas de susceptibilidad, siguiendo el mismo esquema de diluciones antes indicada. (Cuadro 5). Incubar a 30°C por 24-48 horas (o hasta que haya crecimiento visible en los tubos controles).

CONCENTRACION LETAL MINIMA (C.L.M.).

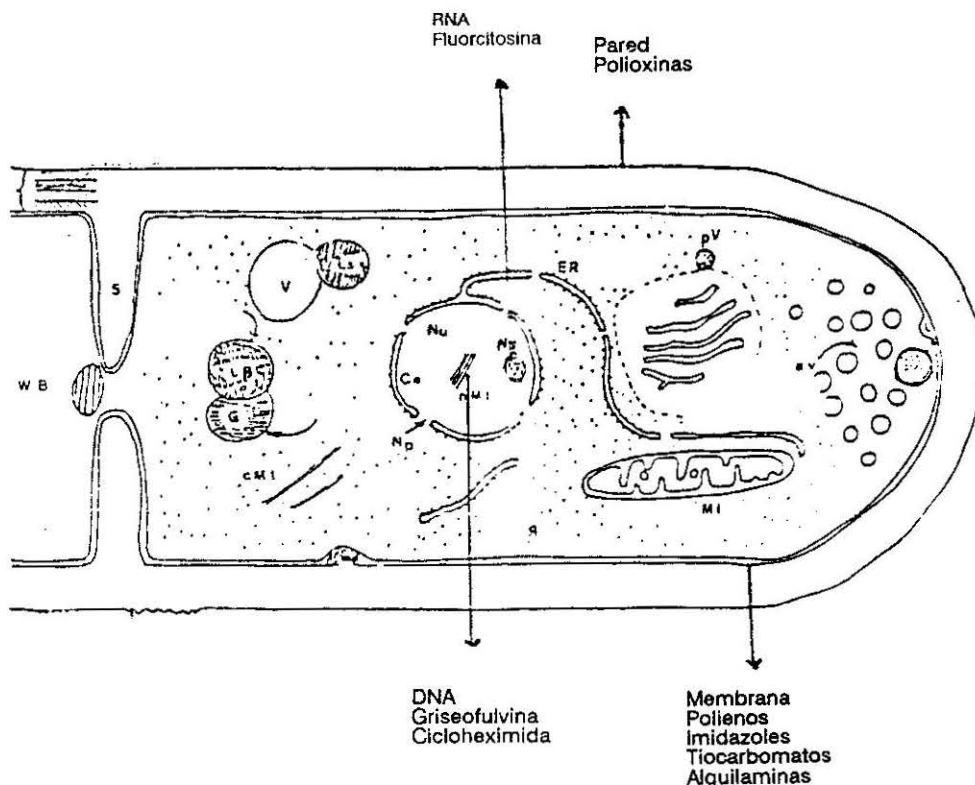
La CIM observada no nos indica si la actividad de la droga antifúngica fue fungicida o fungistática.

Para establecer la CLM se procede como sigue:

Tomar 1 placa Petri con agar Sabouraud y dividirla en 2-12 partes marcando en cada sección la CIM a investigar.

Cuadro 3

Sitio de acción de los antimicóticos sobre las células fúngicas



CUADRO 4

Lectura e interpretación de antifúngicos en discos.

	Diámetro del halo de inhibición	CIM en ug/ml	Concentración del disco	Interpretación
5-Fluorocitosina	30-20 20-10 10	0,04-1,56	1 ug	sensible intermedio resistente
Anfotericina B	20 20-10 10	0,04-0,36 0,36-1 1	100 ug	muy sensible sensible intermedio o resistente
Nistatina	20-10 10		100 UI	sensible intermedio o resistente
Imidazoles	20 10 10	1,56 1,56-6,4 6,4	50 ug	sensible intermedio resistente

* Estos discos se usan principalmente en Europa.

Sembrar la última dilución que presentó crecimiento, más todas aquellas en que no lo hubo con un asa calibrada de 0,005 ml.

Incubar a 30° C por 24-48 hrs. o hasta que se observe crecimiento en el área correspondiente al tubo control (sin droga).

La CLM es la mínima dilución que presenta menos de 3 colonias en la resiembra en agar Sabouraud. (Cuadro 7).

La CIM está dada por aquél tubo de menor dilución que inhibe el desarrollo macroscópico del hongo. El método descrito antes, se puede adaptar a microplacas (2).

CIMs por el método de dilución en agar.

Este método es usado por lo general en laboratorios de investigación o cuando se van a estudiar varias cepas de hongos, pues se pueden estudiar entre 18 (filamentosos) a 36 (levaduras) al mismo tiempo cuando se usan placas. Por este método se pueden estudiar sólo CIMs.

Las diluciones del antimicótico son incorporadas al medio con una concentración de agar de 1,5%. Como algunos antimicóticos se deterioran con la esterilización en autoclave, las drogas o el caldo se deben agregar al agar a no más de 48°-50° C, con un inóculo de 10⁵ UFC/ml.

Preparación de las diluciones en medio sólido.

Pesar (a modo de ejemplo) 20 mgrs de 5-FC en agua destilada estéril o 5 mgrs de anfotericina B en DMSO. La cantidad a pesar debe ser ajustada con la real potencia de la droga. En el caso de la anfotericina B proteger la sustancia de la acción de la luz y dejar reposar unos 30 min. antes de usar, lo que determina su auto-esterilización. En el Cuadro 3 se indican algunos solventes usados con los antimicóticos. En el Cuadro 8 se muestra un esquema de diluciones para 5-FC que se puede utilizar cuando se usan placas. Estos volúmenes se pueden cambiar si sólo se usan una serie o más de tres series de tubos en lugar de placas.

CUADRO 5

Cepas estandar recomendadas para control de antifungigramas.

Hongo	Cepa	Antimicótico
S. cerevisiae	ATCC 36375	Anfotericina B
	ATCC 9763	Anfotericina B
	ATCC 9683	5-Fluorocitosina
Paecilomyces variotti	MSCC 5605	Anfotericina B (Agar blando)
	ATCC 36257	
C. pseudotropicalis	ATCC 28838	Miconazol Ketoconazol
C. albicans	ATCC 10231	Polienos
C. albicans	ATCC 36801	Cilofungina
C. stellatoidea	ATCC 26232	Imidazoles

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SINERGICA.

Kobayashi & Medoff, Kwan y col. y Medoff y col. Kobayashi & Medoff (8, 9, 10, 24) iniciaron los estudios de actividad sinérgica en antifúngicos entre sí o de antifúngicos con antibacterianos, teniendo como base la anfotericina B.

Usando concentraciones sub-inhedorias de Anfotericina B y de 5 fluorocitosina, han demostrado esta actividad.

Los estudios "in vitro" usan generalmente medios líquidos.

El medio usado para anfotericina B más 5-fluorocitosina, es YNB y un buffer no quelante (50 ml/litro), el que es adicionado para evitar la inactivación de la anfotericina B por la caída del pH secundaria a la fermentación del azúcar en el medio líquido.

La CIM es determinada para cada droga por separado y para la combinación en diferentes concentraciones de una droga, mientras la otra permanece constante, como se aprecia en el esquema siguiente.

Otra sinergia conocida es la del Itraconazol con 5-FC (16).

Determinación de antifúngicos en líquidos biológicos.

Junto con la determinación de la actividad sinérgica se hace necesaria la determinación de la concentración del antifúngico en suero u otro líquido biológico (Cuadro 10). Esto tiene por objeto determinar si se están alcanzando los niveles requeridos para inhibir el microorganismo de acuerdo con la CIM, o para establecer los niveles tóxicos (efecto nefrotóxico por anfotericina B, neutropenia, leucopenia, etc.).

El efecto nefrotóxico de la anfotericina B puede ser disminuído con combinaciones de drogas como es el tratamiento estándar para pacientes con meningitis causada por *Cryptococcus neoformans* (34).

Los métodos para medir estos niveles son: cromatografía líquida de presión, enzimo-inmunoensayo y radio-inmunoensayo. Estos métodos son rápidos, precisos, pero necesitan de equipos especiales. Existe además el método biológico de la difusión radial en agar, que es de fácil uso para algunos antimicóticos (31).

En este último procedimiento debe considerarse el medio a usar, la cepa de referencia del hongo para la medición, como también la construcción de una curva estandar. (Cuadro 10).

Niveles séricos de 5-FC superiores a 100-125 ug/ml son potencialmente tóxicos y es la droga para la cual, actualmente, tiene mayor uso este estudio.

cuadros 6 y 8

CUADRO 6

ESQUEMA DE DILUCION EN CALDO PARA 5-FLUORCITOSINA, SOLUCION MADRE DE 1,28 UG/ML*											
Tubos #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Caldo	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Antimicótico 1,28 ug/ml	1	1	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	Eliminar 1 ml
Inóculo	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Concentración final	64 ug/ml	32 ug/ml	16 ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	1 ug/ml	0,5 ug/ml	0,25 ug/ml	0,125 ug/ml	Control

* Esta solución madre se puede diluir 1:10 en solución salina o caldo. Otra forma de hacerlo es agregar el inóculo en volúmenes de 0,9 ml a concentraciones de drogas 10 x más altas. (Ej. 0,9 de $1-5 \times 10^4$ UFC/ml más 0,1 ml de 640 ug/ml de 5-FC y así sucesivamente).

CUADRO 8

Esquema general de preparación de diluciones en medio sólido para 5-FC.

10 ml de solución de antimicótico con 6.400 ug/ml.

Antimicótico	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	eliminar
Sol. salina		2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
ug/ml	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	control	
Antimicótico	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml		
Medio (Agar)	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml	18 ml
ug/ml de medio	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	control	

Sembrar 0,001 - 0,003 ml del inóculo preparado como se ha descrito antes pero sin diluir ($1 - 5 \times 10^6$). Esto se puede hacer manualmente o con replicadores automáticos. De acuerdo con la droga estudiada las placas o tubos se incuban y leen de la manera indicada para el método en caldo.

CUADRO 7
CLM de algunos antimicóticos (23)

Droga	CFM
Anfotericina B	0,2 ug/ml
5-Fluorocitosina	0,05 ug/ml
Micotonazol	0,10 ug/ml

SOLUCION ESTANDAR.

La solución estandar se prepara con 5-fluorocitosina en concentraciones de 6, 25, 12, 25, 50 y 100 ug/ml a partir de una solución estándar en agua destilada en una mezcla de sueros humanos normales.

Los estándares pueden ampolletarse a razón de 0,5-1 ml y guardarse a -20° C hasta por un año.

Se utiliza una cepa de *Candida pseudotropicalis* ATCC 28838 o de *S. cerevisiae* ATCC 36375.

Se prepara inoculando 5 ml de medio YNB con una de la cepas que se incuba a 37°C por una noche. Se ajusta la densidad del cultivo a 10⁷ UFC/ml.

Preparación de las placas.

Mezclar 90 ml de medio morfológico para levaduras (YMA) a 48-50° C e inocularlo con una suspensión (4.0 ml) de la levadura indicada. Distribuir en placas de 25 cm². Una vez solidificado colocar la placa de YMA a 37° C hasta que la superficie esté seca.

Haga 30 orificios en el medio de 4 mm de diámetro (6 filas de 5 orificios cada una).

Introducir 10 ul del estándar o de la muestra del paciente en cada orificio.

Puede incorporarse una muestra de concentración conocida. Cada muestra estándar o especimen en estudio debe hacerse en triplicado.

Las placas son incubadas a 35°-37° C por una noche. Luego medir las zonas de inhibición.

Las medias son calculadas para cada estándar y la muestra. También se puede usar el método de Shadomy y Espinel + Ingroff usando placas de 22x22 cms (29, 31, 33).

CUADRO 9

Modelo de estudio de sinergia entre Anfotericina B y 5-Fluorocitosina (3)

5-Fluorocitosina ug/ml

0 0,45 0,095 0,19 0,39 0,76 1,56 3,13 6,25 12,5 25 50 100

A 0
n 0,0125
f 0,023
o 0,045
t 0,095
e 0,19
r 0,39
i 0,78
c 1,56
i 3,13
n 6,25
a
B

En el ejemplo las concentraciones estudiadas para 5-FC van desde hasta 100 ug/ml. En cambio para anfotericina B van desde 0,045 hasta 6,25 ug/ml.

En el cuadro se anotan las CIM observadas.

Se considera que hay sinergia, cuando una de las drogas disminuye 4 veces su concentración inhibiendo en presencia de la concentración subinhibitoria de la otra.

Cuadro 10

CUADRO 10

Condiciones para medición de antifúngicos en líquidos biológicos por difusión radial en Agar (Shadomy y Espinel-Ingroff) (29)

DROGA	CEPA CONTROL	MEDIO	CURVA ESTANDAR UG/ML	NIVELES TERAPEUTICOS MAXIMOS (UG/ML)
Anfotericina B en ausencia de 5-FC	Paecilomyces variotii ATCC 36257	Medio antibió- tico FDA 12	0,03 - 0,06 0,125 - 0,25 0,5 y 1	En suero 1 - 4 En LCR 0,02 - 1
Anfotericina B en presencia de f-CF	Chrysosporium pruinatum ATCC 36374	Medio antibió- tico FDA 12 + 10 mg citosina/ml	0,03 - 0,06 0,125 - 0,25 0,5 y 1	En suero 1 - 4 En LCR 0,02 - 1
Miconazol	C. stellatoidea ATCC 36232 o C. pseudotro- picalis ATCC 28838	Agar Kimming Sabouraud dextrosa según Emmons	0,5 - 1-2 4 - 8 y 16	En suero 2-8 depen- diendo de dosis En LCR 0,1 - 0,3
5-FC	S. cerevisiae ATCC 36375	YMA pH 6,0	6,25-100	En suero de 60-80 para pacientes con función renal normal. En LCR 40-60 En suero dependiendo de la dosis.
Ketoconazol	C. pseudotropicalis ATCC 28838	Agar Kimming	0,25 - 16	

MICROTTEST DE SUSCEPTIBILIDAD PARA HONGOS. (3)

Este método es rápido, usa microplacas para la dilución del caldo y un indicador como revelador. Es fácil de ejecutar, reproducible y comparable con el método de dilución de tubos.

1. Se usa un medio de cultivo stock que es el YNB adicionado de glucosa al 3%. La solución de trabajo es preparada a partir del medio stock tomando 3 ml de él, los que se diluyen en 24 ml de solución salina. Se ajusta el pH del medio a 7,2 con gotas de Na OH al 10%.
2. Agregar al medio de trabajo 1 mg de azul de bromotimol. Esterilizar por filtración.
3. 200 ul del medio con indicador son agregados a 3 corridas de 12 orificios de la microplaca, con excepción del orificio # 1.
4. Una solución stock del antimicótico (5-FC) de 1000 ug/ml, es preparada, disolviendo 1 mg de la droga en el solvente respectivo. Una dilución 1:10 de la solución stock es hecha en el medio de cultivo de trabajo para obtener una concentración de 100 ug/ml.
5. Hacer diluciones del medio de trabajo con el antimicótico (100 ug/ml) con asas calibradas dilutoras de 50 ul. Un dilutor de 50 ul es cargado con la solución de trabajo de 5-FC y colocado en el orificio # 2. Con un nuevo microdilutor se procede de igual forma desde el orificio 2 al 3 y así sucesivamente hasta el N° 10.
6. Hacer una suspensión de un cultivo incubado por 18-24 hrs., previamente en medio de cultivo con indicador, con una concentración de 10^7 propágulos de hongos. Agregar 50 ul de esta suspensión a cada uno de los orificios con excepción del N° 12, (control-libre de hongos) al cual se le coloca 50 ul de caldo indicador. La concentración final de células fúngicas es de 10^7 por 0,05 ml. El volumen final de cada orificio es de 0,1 ml.
7. Las columnas de la microplaca se sellan con una tira adhesiva, para evitar la evaporación. Incubar por 18-20 hrs. a 35°C. La CIM es determinada observando los cambios de colores del ácido (amarillo).

REFERENCIAS

1. AUGER, P.; DUMAS, C, 7 JULY (1979). A study of 666 strains of *Candida albicans*. Correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosin. J. Inf. Dis. 139: 590-504.
2. ANALSSIE, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. et al. Standardization of antifungal susceptibility testing using microdilution technique. 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. 1989.
3. CHMEL, H. LOURIA. D.B. Antifungal antibiotics: Mechanism of action, resistance, susceptibility testing and assays of activity in biological fluids. In Lorian V. (Ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine. Willians and Wilkins, Baltimore 1980.
4. DROUHET, E. DUPONT, B. (1983). Laboratory and clinical assessment of ketoconazole in deep seated mycosis. J. Med. 74 (Suppl 1B): 30-47.
5. ESPINEL-INGROFF, A., SHADOMY, S., WHITE, S. (1980). Correlation of 10 and 20 ug Experimental Diffusion LY 121019 Discs with Agar Dilution Mics Against isolated of *Candida* spp. 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
6. ESPINEL-INGROFF, A. & SHADOMY, S. (1989). In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Eur. J. Clin. Microbiol. 8: 352-362.
7. ESPINES-INGROFF, A., SHADOMY, S., WHITE, S. (1989). In vitro studies with LY 121019, Flucytosine and Amphotericin B against isolated of *Candida* spp and *Torulopsis glabrata* 28th ICAAC Meeting.
8. ESPINEL-INGROFF, A. & KERKERING, T.M. (1980). Standardization of inoculum preparation of *Sporothrix schenckii* and other filamentous fungi for susceptibility testing, 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.

9. ESPINEL-INGROFF, A., SHADOMY, A.; GEBHARDT, R.J. (1984). In vitro studies with R51,211 (itraconazole). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26: 5-9.
10. FAERGEMAN, J.; BERNARDER, S.; DJARY, L.; FEDRIKSSON, T. & WYNANTS, J. (1981). Solubility of antimycotics: A problem "in vitro" experiments. *Acta Dermatovenereol (Stockholm)* 61: 356-358.
11. GALGIANI, J.N.; REISER, C.; BRASS, C.; ESPINEL-INGROFF, A.; GORDON, M.A.; KERKERING, T.M. (1987). Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 31: 1342-1347.
12. GORDEE, R.S.; ZECKNER, D.J.; ELLIS, L.F.; THAKKAR, A.L.; HOWARD, L.C. (1984). In vitro and in vivo anti-*Candida* activity and toxicology of LY 121019. *Journal of Antibiotics* 37: 1054-1065.
13. HOEPRICH, P.D.; FINN, P.D. (1972). Obfuscation of the activity of antifungal antimicrobics by culture media. *Journal of Infectious Diseases* 126: 353-361.
14. HADFIELD, T.L.; SMITH, M.B.; WINN, R.E.; RINALDI, M.G.; GUERRA, C. (1987). Mycosis caused by *Candida lusitanae*. *Reviews of Infectious Diseases* 9: 1006-1012.
15. IWATA, K. & VANDEN BOSSCHE (Ed.) (1986). In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
16. KERKERING, T.M.; ESPINEL-INGROFF, A. (1987). In vitro synergistic activity of itraconazole and 5-fluorocytosine against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. In: Fromtling, R.A. (ed): Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. J.R. Prous, Barcelona, P 61-70.
17. KOBAYASHI, S.S. & MEDOFF, G. (1977). Antifungal agents recent developments. *ANN. REV. Microbiol.* 31: 291-308.
18. KOBAYASHI, G.S. & MEDOFF, G. (1983). Measurement of activity of antifungal drugs in: Howard, D.H. *Fungi pathogenic for human and animals. Part B.* Marcel Dekker Inc. N.Y.
19. KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G.; SCHLESSINGER, D.; Kwan, C.C. & MUSSER, W.E. (1972). Amphotericin B potentiation of rifampicin as an antifungal agent against the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 177: 708-71.
20. KUAN, C.N.; MEDOFF, G., KOBAYASHI, G.S.; SCHLESSINGER, D. & RASKAS, H. J. (1972). Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemoter* 2: 61-65.
21. MALLIE, M.; JOUVERT, S.; LEBECO, J.C. & BASTIDE, J.M. Valeur comparee de differents methodes avolution de la C.M.I. des antifongiques: sensibilite the *Candida albicans* a l econozole. *Bull. Sp. Mycol. med.* 121: 155-160, 1982.
22. MARRIOT, M.S.; RICHARDSON. K. (1987). The discovery and mode of action of fluconazole. in: Fromtling, R.A. (ed.) *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents.* J.R. Prous, Barcelona, p. 81-92.
23. MCGINNIS, M.R. (1982). *Clinical Mycology. Laboratory Procedure Manual* North Carolina.
24. MEDOFF, G.; CONFORD, M. & KOBAYASHI, G.S. Synergistic action of amphotericina B and 5-fluorocytosin against yeast like organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*
25. PFALLER, M.A.; BURMEISTER, M.S.; RINALDI, M. G. (1988). Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1437-1441.
26. PFALLER, M.A.; GALGIANI, J.N. & RINALDI, M. (1989). THE NCCLS antifungal susceptibility testing working group. Colaborative investigation of variables in antifungal susceptibility testing, 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
27. PLEPEL, M.; BERG, D.; BUCHEL, K.-H. & ABBINK D. (1987). Test methods for antifungal agents - a critical review. *Mykosen* 30: 28-37.
28. SEGUELA, J.P.; LEPARGNEUR, J.P.; SAVARES, C.; CASAUX, M.; RIJER, A. & LINAS. M.D. (1980). Antifungal antibiotics sensitivity testing. Use of autobact for standardization purpose. *Mycopathology* 72: 13-16.
29. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGH, Y. (1985). Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility test and bioassays. in *Manual of Clinical Microbiology.* Lennette. E.H. (Rd.). Fourth edition, A.S.M. Wash.
30. SHADDMY, S.; WAGNER, G.; ESPINEL-INNGROFF, A.; DAVIS B.A. (1975). In vitro estudies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8: 117-121.

31. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A. (1984). Methoda for bioassay of fungical agents in biologic fluids. In: Lastin, A.I., Lechevalier, H.A. (ed): CRC handbook of microbiology. CRC Press, Boca Raton p. 327-337.
32. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GEBHART, R. J. (1985). In vitro studies with SF 86-327, a new orally active allylamine derivative. Journal of Medical and Veterinary Mycology 23: 125-132.
33. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; TARTAGLIONE, T.A.; DISMUKES, W.E. and the NIAID Mycosis Study Group: (1986). Treatment of systemic with ketoconazole: studies of ketoconazole serum levels. Mykosen 29 195-209.
34. STAMM, A.M.; DOASID, R.B.; DISMUKES, W.E.; SHADOMY, S.; CLOUD, G.A., BOWLES, C.A.; KARAM, G.H.; ESPINEL-INGROFF, A. (1987). Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. American Journal of Medicine 83: 236-242.
35. STVENS, D.A. Antifungal drug susceptibility testing. Mycopathologia 87: 135-40, 1984.
36. TROKE, P.F.; ANDREWS, R.J.; BRAMMER, K.W.; MARRIOT, M.S.; RICHARDSON, K. Efficacy of UK-49,858 (fluconazole) against *Candida albicans* experimental infections in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 28: 815-818, 1985.
37. WOODS, R.A.; BARD, M.; JACKSON, I.E.; DRUTZ, D.J. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. Journal of Infectious Diseases 129: 53-59, 1979.
38. WASHINGTON, J.A. II (Ed.) Laboratory procedures in clinical microbiology (Cap. 17) Little, Brown & Co, Boston 1974.
39. ZAROR, L.; OTTH, L. & MULTIZABAL, I. Susceptibilidad in vitro de dermatofitos, *Candida* y otros hongos frente a tolclolato. Estudio comparativo de dos inóculos. Rev. Arg. Micología 9: 18-22, 1986.