



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Carmen Castro Méndez\*, Estefanía García Sánchez y Estrella Martín-Mazuelos

Servicio de Microbiología, Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Métodos de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos  
CLSI  
EUCAST  
Vitek 2  
Sensititre Yeast One  
Neo Sensitabs  
Etest  
MALDI-TOF  
Genes de resistencia  
Hongos

Las infecciones fúngicas, incluyendo aquellas producidas por hongos que pueden ser resistentes o multirresistentes a los antifúngicos, representan un serio problema de salud pública. La información sobre la sensibilidad de estos microorganismos a los distintos antifúngicos debe ser analizada lo más rápidamente posible para ayudar a los profesionales clínicos a instaurar un tratamiento adecuado. Desafortunadamente, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas ni implementadas como las de los antibacterianos, que son similares tanto en su diseño como en su precisión y reproducibilidad, pero laboriosas y lentas. En este artículo realizamos una revisión de los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro*, tanto los de referencia (CLSI y EUCAST) como los comerciales y los nuevos métodos basados en la proteómica (MALDI-TOF MS) y en la detección de genes de resistencia por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Además, se comentan los nuevos puntos de corte clínicos establecidos recientemente, así como los puntos de corte epidemiológicos, que se trata de una nueva categoría que puede ayudar a identificar de manera precoz las cepas aisladas que han adquirido mecanismos de resistencia. También se comentan las ventajas y las limitaciones de cada uno de los métodos revisados. Por tanto, puede concluirse que, aunque se ha avanzado mucho en los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, aún existen limitaciones en su aplicación en la práctica diaria de un laboratorio de microbiología aunque parece que el futuro es esperanzador con las nuevas tecnologías basadas en la proteómica y en la amplificación de los ácidos nucleicos. Información sobre el suplemento: este artículo forma parte del suplemento titulado «Programa de Control de Calidad Externo SEIMC. Año 2016», que ha sido patrocinado por Roche, Vircell Microbiologists, Abbott Molecular y Francisco Soria Melguizo, S.A.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Updating of *in vitro* antifungal susceptibility tests

#### ABSTRACT

#### Keywords:

*In vitro* antifungal susceptibility testing  
CLSI  
EUCAST  
Vitek 2  
Sensititre Yeast One  
Neo Sensitabs  
Etest  
MALDI-TOF  
Resistance genes  
Fungi

Fungal diseases, including those caused by (multi)drug-resistant fungi, still represent a global public health concern. Information on the susceptibility of these microorganisms to antifungal agents must be quickly produced to help clinicians initiate appropriate antifungal therapies. Unfortunately, antifungal susceptibility tests are not as developed or widely implemented as antibacterial tests, being similar in design, accuracy and reproducibility, but also laborious and slow. In this article, we review the methods of *in vitro* susceptibility testing, both reference (CLSI and EUCAST), commercial and new methods based on proteomics (MALDI-TOF MS) and in the detection of resistance genes by nucleic acid amplification techniques. In addition, we discuss the newly established clinical breakpoints, as well as the epidemiological cut-off points, which constitute a new category that can help in the early identification of isolates that have acquired resistance mechanisms. We also discuss the advantages and limitations of each of the methods studied. Therefore, we can conclude that, although there has been much progress in studies of *in vitro* susceptibility

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carmenmendez@hotmail.com (C. Castro Méndez).

testing to antifungals, there are still limitations in its application in the daily routine of microbiology laboratories, although it seems that the future is promising with the new technologies based on proteomics and nucleic acid amplification. Supplement information: This article is part of a supplement entitled «SEIMC External Quality Control Programme. Year 2016», which is sponsored by Roche, Vircell Microbiologists, Abbott Molecular and Francisco Soria Melguizo, S.A.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Introducción y fundamentos de las técnicas de determinación *in vitro* de sensibilidad antifúngica

Las infecciones fúngicas representan un serio problema de salud pública, incluyendo aquellas producidas por hongos que pueden ser resistentes o multirresistentes a los antifúngicos. La información sobre la sensibilidad de estos microorganismos a los distintos antifúngicos debe ser analizada para ayudar a los profesionales clínicos a instaurar un tratamiento adecuado<sup>1,2</sup>. Desafortunadamente, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas ni implementadas como las de los antibacterianos, que son similares tanto en su diseño como en su precisión y reproducibilidad, pero laboriosas y lentas<sup>1-3</sup>.

Los objetivos de la realización del antifungigrama son: conocer la actividad *in vitro* de los antifúngicos; pronosticar el resultado terapéutico de determinado tratamiento antifúngico; detectar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible; correlacionar la actividad *in vitro* con los resultados *in vivo*, y determinar la utilidad terapéutica de los nuevos antifúngicos.

De todos ellos, el principal fundamento de las pruebas de sensibilidad *in vitro* es detectar las cepas aisladas resistentes entre la población sensible o el desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

Para conseguir estos objetivos, se necesitan métodos para el estudio de sensibilidad reproducibles y disponer de puntos de corte clínicos para la interpretación de sus resultados. El CLSI (Committee for Clinical and Laboratory Standards) y el EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) han desarrollado métodos de referencia reproducibles, aunque laboriosos, para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras y hongos filamentosos.

Para la interpretación de estos métodos se han definido una serie de conceptos<sup>2,4,5</sup>: *concentración mínima inhibitoria* (CMI), que es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del microorganismo; *concentración mínima efectiva* (CME), que es la concentración más baja de candina que produce un cambio morfológico (colonias pequeñas, redondeadas y compactas, en lugar de hifas) y se utiliza para definir la actividad de las candinas sobre hongos filamentosos; *puntos de corte clínicos* (CBP, *clinical breakpoints*), que clasifican las cepas aisladas en clínicamente sensibles o clínicamente resistentes y se establecen basándose en la correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y la eficacia terapéutica, distribución de las CMI, parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) y mecanismos de resistencia del antifúngico (existe una correlación entre estos puntos de corte y el éxito/fracaso terapéutico), y *puntos de corte epidemiológicos* (ECV, *epidemiological cutoff value* para el CLSI y ECOFF para EUCAST), que son la concentración más elevada que separa la población salvaje (sin ningún mecanismo de resistencia) de las cepas aisladas con algún mecanismo de resistencia, no pertenecientes a la población salvaje. Las cepas aisladas inhibidas con CMI superiores al ECV o ECOFF se clasifican como cepas aisladas con sensibilidad reducida. Pueden responder al tratamiento si la CMI del antifúngico es inferior al punto de corte clínico. Se calcula para cada antifúngico y especie a partir de la CMI modal y distribución de las CMI, teniendo en cuenta la variabilidad inherente a la técnica, y debe incluir, al menos, al 95% de la población. A partir de estos ECV o ECOFF, las cepas se pueden clasificar en población salvaje (WT, *wild type*): para una especie determinada, una cepa aislada se

define como perteneciente a la población salvaje por la ausencia de mutación adquirida o de mecanismos de resistencia. Las cepas aisladas se clasifican como pertenecientes a la población salvaje si la CMI del antifúngico en cuestión es menor o igual al ECV o ECOFF. Si la CMI es mayor que el ECV o ECOFF, se afirma que la cepa aislada no pertenece a la población salvaje (NWT). Las cepas aisladas solo se pueden clasificar como resistentes a un antifúngico cuando se ha determinado el CBP.

## Métodos de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de levaduras y hongos filamentosos

El CLSI ha estandarizado 2 métodos para determinar la sensibilidad a los antifúngicos:

1. El método de microdilución en caldo para levaduras (documentos M27-A4<sup>5</sup>, M60<sup>6</sup>, M57<sup>4</sup> y M59<sup>7</sup>) y para hongos filamentosos y dermatofitos (documentos M38-A3<sup>8</sup>, M61<sup>9</sup>, M57<sup>4</sup> y M59<sup>7</sup>).
2. El método de difusión en agar para levaduras (documentos M44-A2<sup>10</sup> y M60<sup>6</sup>) y para hongos filamentosos no dermatofitos (documentos M51-A<sup>11</sup> y M61<sup>9</sup>).

El EUCAST también ha estandarizado un método de microdilución para levaduras (documento E.DEF 7.3.1)<sup>12</sup> y para hongos filamentosos (documento E.DEF 9.3)<sup>13</sup>.

Los métodos CLSI y EUCAST son similares, pero presentan ciertas diferencias metodológicas en relación con la concentración de glucosa del medio de cultivo, forma del fondo de la microplaca, inóculo (más elevado en el caso del EUCAST), tipo de lectura y tiempo de incubación, pero los resultados obtenidos por ambos métodos son similares.

Es importante realizar las pruebas de sensibilidad siguiendo estrictamente los documentos ya que cualquier variable (medio de cultivo, incubación, inóculo, etc.) puede alterar los resultados, por lo que es imprescindible incluir una cepa control de calidad para confirmar la validez del ensayo. Los métodos de dilución estandarizados son muy laboriosos para ser utilizados en la práctica diaria del laboratorio y, aunque ya se dispone de métodos del CLSI estandarizados de difusión en placa tanto para levaduras como para hongos filamentosos<sup>6,9-11</sup> más baratos y sencillos de realizar, siempre es recomendable ante una cepa aislada resistente por el método de difusión confirmar por el método estandarizado de dilución (CLSI o EUCAST).

## Limitaciones de los métodos de referencia

Estos métodos, además de ser laboriosos y lentos, presentan otra serie de limitaciones: los métodos de microdilución CLSI-M27-A4<sup>5</sup> y EUCAST DOC.E.7.3.1.<sup>12</sup> para levaduras solo son aplicables para *Candida* spp y *Cryptococcus* spp aunque podrían aplicarse a otras levaduras, excepto *Malassezia* spp; tanto los CBP como los ECV/ECOFF descritos son aplicables solo a los antifúngicos sistémicos; el CLSI<sup>5</sup> tiene como limitación la dificultad de detectar las cepas aisladas de levaduras resistentes a anfotericina B, mientras que el documento EUCAST E.DEF. 7.3.1.<sup>12</sup> recomienda la utilización del medio AM3 (Medio Antibiótico 3) suplementado con el 2% de glucosa para detectar resistencia a anfotericina B aunque están descritas variaciones entre distin-

tos lotes y fabricantes<sup>12</sup>; la lectura de los resultados es difícil y subjetiva, y puede producir resultados variables y no reproducibles, especialmente cuando la lectura es visual (CLSI), por lo que se necesita personal entrenado; el método CLSI de difusión para levaduras (M44-A2)<sup>10</sup> solo es aplicable para *Candida* spp y el EUCAST no tiene documento para método de difusión; el método de microdilución para hongos filamentosos y dermatofitos (CLSI M38-A3)<sup>8</sup> no incluye CBP para ningún hongo, solo describen algunos ECV para *Aspergillus* spp, en el documento EUCAST<sup>14</sup> se establecen puntos de corte para anfotericina B y azoles y algunas especies de *Aspergillus*, pero no para equinocandinas; el método de difusión del CLSI para hongos filamentosos (M51-A)<sup>11</sup> no incluye a los dermatofitos y el EUCAST no tiene documento para método de difusión, y diferencias entre los CBP de CLSI y EUCAST (a veces, mayor a 2 diluciones) hacen difícil la interpretación clínica.

Ninguno de los métodos de microdilución de referencia (CLSI y EUCAST) para el estudio de sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp recomienda ensayar la sensibilidad a caspofungina por existir alta variabilidad interlaboratorios. Se recomienda realizar solo la sensibilidad *in vitro* a micafungina y anidulafungina como marcadores de sensibilidad a caspofungina<sup>15,16</sup>.

### Métodos alternativos

Debido a todas estas limitaciones, los métodos de referencia no son aplicables en la práctica de un laboratorio clínico y por ello, unido a la imposibilidad de que estos métodos puedan ser útiles para la determinación de sensibilidad a todos los antifúngicos y a todos los microorganismos, se han desarrollado métodos comerciales más sencillos:

1. Método colorimétrico (Sensititre YeastOne®, Thermo Scientific, Estados Unidos): es un método colorimétrico basado en la metodología de microdilución del CLSI. Está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para estudios de sensibilidad *in vitro* de levaduras no fastidiosas a fluconazol, itraconazol, voriconazol, 5-fluorocitosina y caspofungina. Aunque también incluye anfotericina B, posaconazol, anidulafungina y micafungina, la FDA no los ha aprobado para el diagnóstico. Todos tienen marcado CE para su uso en Europa<sup>2</sup>. Existen datos en la bibliografía que muestran una buena correlación con el método de referencia CLSI, tanto para levaduras<sup>2,17,18</sup> como para hongos filamentosos<sup>2,19,20</sup>. Es importante saber que este método debe utilizar para la interpretación de los resultados los CBP y los ECV de los documentos del CLSI<sup>6,7,21</sup>. Muestra baja correlación con caspofungina y *C. glabrata* y *C. krusei*<sup>22</sup>. Espinel-Ingroff et al<sup>23</sup> determinan ECV para *Candida* spp y caspofungina por este método, y observan que, utilizando estos ECV, se puede discriminar entre cepas de *Candida* spp *wild type* y *non-wild type*. Los azoles presentan efecto *trailing*, que dificulta su lectura.
2. Vitek 2® (bioMérieux, Francia): es un método basado también en la metodología de la microdilución del CLSI. Incluye 6 antifúngicos, de los cuales se han aprobado para diagnóstico por la FDA solo fluconazol, voriconazol y caspofungina<sup>2,18</sup>. Muestra buena correlación para *Candida* spp con los métodos de microdilución de referencia (CLSI y EUCAST)<sup>17,24-27</sup>. La principal limitación del Vitek 2® es que la menor concentración de caspofungina es 0,25 mg/l, que es más alta que el punto de corte (CBP) que establece el CLSI para *C. glabrata*, por lo que clasifica a cepas de *C. glabrata* resistentes (con mutación *fsk* demostrada) a caspofungina como sensibles<sup>25</sup>. Presenta buena correlación con los azoles<sup>17,22,27</sup> aunque con voriconazol pasa algo parecido a la caspofungina, pues utiliza unos rangos de CMI muy altos que producen errores de interpretación<sup>21</sup>. Existe baja correlación con anfotericina B y *Cryptococcus* spp<sup>17,27</sup>. No existen datos para hongos filamentosos.

3. Métodos de difusión en agar: Neo-sensitabs® (Rosco Laboratory, Dinamarca): son tabletas que incluyen prácticamente todos los antifúngicos, incluidos los tópicos y los sistémicos. Existen datos de buena correlación con los métodos de referencia de microdilución y difusión en agar con discos<sup>10,11</sup>, tanto para levaduras<sup>28,29</sup> como para hongos filamentosos<sup>30-32</sup>.
4. Etest® (bioMérieux, Francia) y otras tiras de gradiente de difusión MIC Test Strips® (Liofilchem, Werfen, España): es un método de difusión en agar basado en el uso de unas tiras de papel impregnadas con un gradiente de concentración de antifúngico. Aprobado por la FDA para estudio de sensibilidad *in vitro* de levaduras a fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y 5-fluorocitosina<sup>2</sup>. Con marcado CE también. Existe una buena correlación con los métodos de referencia (CLSI y EUCAST) tanto para los azoles como para las equinocandinas<sup>2,17,18,33-35</sup>, pero, para conseguirlo, es imprescindible seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante y la lectura debe ser realizada por personal experimentado. En el caso del fluconazol, se recomienda que, cuando una cepa aislada sea resistente por Etest®, se confirme con el método de referencia ya que los valores de CMI por Etest para fluconazol son altos<sup>36</sup>. Parece que es el método de referencia para la detección de cepas resistentes a anfotericina B<sup>2,18</sup>. La correlación con CLSI es baja para caspofungina con *C. glabrata* y *C. krusei*<sup>37,38</sup>, por lo que no se recomienda en estos casos. Para hongos filamentosos existen estudios<sup>32,39</sup> que avalan su uso para el análisis de sensibilidad *in vitro* a los distintos antifúngicos aunque hay que tener en cuenta que existen problemas de lectura con las equinocandinas<sup>40</sup> y que no es un método recomendado para mucorales<sup>41</sup>. Este método no está recomendado todavía por la FDA para el diagnóstico. Recientemente, Espinel-Ingroff et al<sup>42</sup> recomiendan el Etest® como factor pronóstico de resistencia a equinocandinas y a anfotericina B de *Aspergillus* spp, utilizando los CBP y ECV del CLSI, al igual que lo recomiendan para el estudio de sensibilidad *in vitro* para *A. fumigatus* y posaconazol<sup>43</sup>.

### Limitaciones de los métodos comerciales

Son métodos lentos, pero menos laboriosos que los de referencia, y las limitaciones que presentan son: subjetividad de la lectura de las CMI, sobre todo si esta lectura es visual ya que puede conllevar una lectura no reproducible y resultados no fiables (Etest® y Sensititre YeastOne®); falta de correlación con los métodos de referencia para *Cryptococcus* spp y anfotericina B (Vitek 2®), y falta de capacidad de detección de cepas resistentes a anfotericina B y caspofungina (Sensititre YeastOne® y Vitek 2®) y voriconazol (Vitek 2®).

### Nuevos métodos

Se están desarrollando nuevas herramientas con un futuro esperanzador para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, principalmente orientadas a la metodología proteómica (MALDI-TOF MS) y al campo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Hay estudios recientes que sugieren que MALDI-TOF MS puede ser utilizado para la detección de resistencias a antifúngicos, tanto para levaduras como para hongos filamentosos<sup>1</sup>. Sin embargo, otros no lo recomiendan por no aportar mejoras respecto a los métodos de sensibilidad convencionales y no reducir el tiempo de respuesta<sup>44</sup>.

Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos<sup>45,46</sup> permiten la detección de mutaciones de genes relacionadas con la resistencia a antifúngicos. En el caso de los azoles y levaduras, son *MDR* o *CDR* y *ERG11*, y en los hongos filamentosos, el gen *Cyp51A*; en cuanto a la resistencia a equinocandinas, las mutaciones se encuentran en genes *FKS* y *FKS1* para todas las especies *Candida* y hongos filamentosos, y el gen *KFS2* para *C. glabrata*<sup>1</sup>.

### Interpretación de resultados de las técnicas de determinación de la sensibilidad antifúngica

Según el valor de la CMI mediante los métodos de dilución CLSI y EUCAST, las cepas se clasifican en sensibles (S), intermedias (I), sensibles dependiendo de la dosis administrada (S-DD) y resistentes (R). La categoría S-DD no se incluye en las bacterias. Se ha establecido en función de la dosis de antifúngico administrada y para fluconazol exclusivamente. En la tabla 1 se especifican los puntos de corte clíni-

cos (CBP), puntos de corte epidemiológicos (ECV/ECOFF) del CLSI y del EUCAST para *Candida* spp, y en la tabla 2, para *Aspergillus* spp por los métodos de microdilución.

Para *Candida* spp, CLSI no establece CBP para itraconazol, isavuconazol, posaconazol y anfotericina B, pero define ECV para estos antifúngicos (tabla 1) y en el caso de *Aspergillus* spp solo define ECV (tabla 2). EUCAST no establece puntos de corte para caspofungina e isavuconazol y *Candida* spp, definiendo ECV para estos antifúngicos (tabla 1). Para *Aspergillus* spp establece puntos de corte

**Tabla 1**  
Puntos de corte clínicos (CBP) y puntos de corte epidemiológicos (ECV/ECOFF) para *Candida* spp<sup>6,7,14,47</sup>

		Puntos de corte clínicos (mg/l)						Puntos de corte epidemiológicos (mg/l)					
		S ≤		I		S-DD		R ≥		WT ≤		NWT ≥	
		CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	
Anidulafungina	<b>C. albicans</b>	0,25	0,03	0,5			<b>1</b>	<b>0,06</b>	0,12		0,25		
	<i>C. auris</i>								0,5	1	1	2	
	<i>C. dubliniensis</i>		-						0,12		0,25		
	<i>C. glabrata</i>	0,12	0,06	0,25			0,5	0,12	0,25		0,5		
	<i>C. guilliermondii</i>	2		4			8		8		16		
	<b>C. krusei</b>	0,25	0,06	0,5			<b>1</b>	<b>0,12</b>	0,25		0,5		
	<i>C. lusitanae</i>								1		2		
	<b>C. parapsilosis</b>	<b>2</b>	<b>0,002</b>	4			8	8	8		16		
	<b>C. tropicalis</b>	0,25	0,06	0,5			<b>1</b>	<b>0,12</b>	0,12		0,25		
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	0,25		0,5			1						
	<i>C. glabrata</i>	0,12		0,25			0,5						
	<i>C. guilliermondii</i>	2		4			8						
	<i>C. krusei</i>	0,25		0,5			1						
	<i>C. parapsilosis</i>	2		4			8						
	<i>C. tropicalis</i>	0,25		0,5			1						
Micafungina	<b>C. albicans</b>	<b>0,25</b>	<b>0,016</b>	0,5			1	0,03	0,03		0,06		
	<i>C. auris</i>								0,5	0,5	1	1	
	<i>C. dubliniensis</i>								0,12		0,25		
	<i>C. glabrata</i>	0,06	0,03	0,12			0,25	0,06	0,03		0,06		
	<i>C. guilliermondii</i>	2		4			8		2		4		
	<i>C. krusei</i>	0,25		0,5			1		0,25		0,5		
	<i>C. lusitanae</i>								0,5		1		
	<b>C. parapsilosis</b>	<b>2</b>	<b>0,002</b>	4			8	4	4		8		
	<i>C. tropicalis</i>	0,25		0,5			1		0,06		0,12		
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	2	2			4	8	8	0,5		1		
	<i>C. dubliniensis</i>								0,5		1		
	<i>C. glabrata</i>		0,002			≤ 32	64	64	8		16		
	<i>C. guilliermondii</i>								8		16		
	<i>C. lusitanae</i>								1		2		
	<i>C. parapsilosis</i>	2	2			4	8	8	1		2		

Continúa en pág. siguiente

Tabla 1 (cont.)

		Puntos de corte clínicos (mg/l)						Puntos de corte epidemiológicos (mg/l)					
		S ≤		I		S-DD		R ≥		WT ≤		NWT ≥	
		CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	
Itraconazol	<i>C. tropicalis</i>	2	2			4	8	8		1		2	
	<i>C. neoformans</i>									8			
	<i>C. albicans</i>		0,06							0,12		0,06	
	<i>C. auris</i>									0,5	0,5	1	1
	<i>C. dubliniensis</i>		0,06							0,12		2	4
	<i>C. glabrata</i>									4	2	8	4
	<i>C. krusei</i>									1	1	2	2
	<b><i>C. lusitaniae</i></b>									<b>1</b>	<b>0,125</b>	<b>2</b>	<b>0,25</b>
	<i>C. parapsilosis</i>		0,125					0,25	0,25		0,125		0,25
	<i>C. tropicalis</i>		0,125					0,25	0,25	0,5	0,125	1	0,25
Isavuconazol	<i>C. auris</i>									-	1	-	2
	<i>C. dubliniensis</i>										0,06		0,125
Posaconazol	<i>C. albicans</i>		0,06							0,12		0,06	0,12
	<i>C. auris</i>									-	0,25	-	0,5
	<i>C. dubliniensis</i>		0,06							0,12			
	<i>C. glabrata</i>										1		2
	<i>C. guilliermondii</i>										0,5		1
	<i>C. krusei</i>										0,5		1
	<i>C. lusitaniae</i>										0,06		0,12
	<i>C. parapsilosis</i>		0,06							0,12	0,25		0,5
	<i>C. tropicalis</i>		0,06							0,12	0,12		0,25
	Voriconazol	<i>C. albicans</i>	0,12	0,06	0,25-0,5			1	0,5		0,03		0,06
<i>C. dubliniensis</i>			0,06					0,5					
<i>C. glabrata</i>										0,25		0,5	
<i>C. krusei</i>		0,5		1			2			0,5		1	
<i>C. parapsilosis</i>		0,12	0,12	0,25-0,5			1	0,5		0,03		0,06	
<i>C. tropicalis</i>		0,12	0,12	0,25-0,5			1	0,5		0,12		0,25	
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>		1							2		2	4
	<i>C. auris</i>									2	1	4	2
	<i>C. glabrata</i>		1							2		2	4
	<i>C. krusei</i>		1							2		2	4
	<i>C. parapsilosis</i>		1							2		2	4
	<i>C. tropicalis</i>		1							2		2	4

\*En negrita se especifican las especies con puntos de corte clínicos (CBP) o puntos de corte epidemiológicos (ECV/ECOFF) que presentan diferencia de más de 2 diluciones entre los 2 métodos de referencia (CLSI Y EUCAST).

CLSI: Committee for Clinical and Laboratory Standards; EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing; I: cepas intermedias; NWT: *non-wild type* (no pertenece a la población salvaje); S: cepas sensibles; S-DD: cepas sensibles dependiendo de la dosis administrada; R: cepas resistentes; WT: *wild type* (población salvaje).

para itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol y anfotericina B, solo para algunas especies. Sin embargo, para caspofungina no establece ni CBP ni ECV (tabla 2). En el caso de la especie

emergente *C. auris*, se han descrito recientemente ECV/ECOFF para anidulafungina, micafungina, itraconazol y anfotericina B (CLSI y EUCAST) (tabla 1), mientras que para isavuconazol y posaconazol

**Tabla 2**Puntos de corte clínicos (CBP) y puntos de corte epidemiológicos (ECV/ECOFF) para *Aspergillus* spp.<sup>7,14</sup>

		Puntos de corte clínicos (mg/l)						Puntos de corte epidemiológicos (mg/l)				
		S ≤		I		R ≥		WT ≤		NWT ≥		
		CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
Caspofungina	<i>A. flavus</i>							0,5		1		
	<i>A. fumigatus</i>							0,5		1		
	<i>A. niger</i>							0,25		0,5		
	<i>A. terreus</i>							0,12		0,25		
Itraconazol	<i>A. flavus</i>		1					4		1		2
	<i>A. fumigatus</i>		1					4		1		2
	<i>A. nidulans</i>		1					4		4		8
	<i>A. niger</i>								4		8	
	<i>A. terreus</i>		1					4		2		4
Voriconazol	<i>A. flavus</i>								2		4	
	<i>A. fumigatus</i>		1					4		1		2
	<i>A. niger</i>								2		4	
	<i>A. terreus</i>								2		4	
Posaconazol	<i>A. flavus</i>								0,5		1	
	<i>A. fumigatus</i>		0,125					0,5				
	<i>A. niger</i>								2		4	
	<i>A. terreus</i>		0,125					0,5		1		2
Isavuconazol	<i>A. flavus</i>								1	2	2	4
	<i>A. fumigatus</i>		1					2		1		2
	<i>A. nidulans</i>		0,25					0,5				
	<i>A. niger</i>								4	4	8	8
	<i>A. terreus</i>		1					2		1		2
Anfotericina B	<i>A. flavus</i>								4		8	
	<i>A. fumigatus</i>		1					4		2		4
	<i>A. niger</i>		1					4		2		4
	<i>A. terreus</i>								4		8	
	<i>A. versicolor</i>								2		4	

CLSI: Committee for Clinical and Laboratory Standards; EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing; I: cepas intermedias; NWT: *non-wild type* (no pertenece a la población salvaje); S: cepas sensibles; S-DD: cepas sensibles dependiendo de la dosis administrada; R: cepas resistentes; WT: *wild type* (población salvaje).

solo hay datos por el EUCAST<sup>47</sup>. *Cryptococcus* spp solo tiene definido ECV por CLSI<sup>7</sup>.

### ¿Cuándo se deben realizar pruebas de sensibilidad antifúngica?

El mejor test de sensibilidad es una correcta identificación del microorganismo causante de la infección. Si se conoce la especie, se puede pronosticar su sensibilidad por los datos epidemiológicos de los cuales se dispone. Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos deben realizarse en<sup>48-50</sup> todas las micosis invasivas; las micosis orofaríngeas y mucofaríngeas que no responden al tratamiento; en las micosis producidas por patógenos emergentes en las cuales no se dispone de datos previos de su sensibilidad; ante cualquier tipo de

micosis que no responda al tratamiento administrado, y cuando se desea conocer la prevalencia de cepas resistentes en el hospital.

### ¿Cuándo se deben utilizar los métodos de referencia para determinar la sensibilidad a los antifúngicos?

Aunque los métodos de referencia son laboriosos y deben realizarse por personal experimentado, hay situaciones en que su uso es imprescindible, como<sup>48-50</sup> confirmar las cepas aisladas resistentes obtenidas por otros métodos; cuando se estudia la actividad de nuevos antifúngicos; en la determinación de los puntos de corte clínicos y epidemiológicos; siempre que se quiera evaluar un método comercial, y en estudios epidemiológicos.

Ante una cepa aislada resistente a un antifúngico, por cualquiera de los métodos de sensibilidad, se recomienda comprobar la identificación de la especie aislada y la pureza del cultivo, y repetir el estudio de sensibilidad utilizando siempre un método de referencia de dilución (CLSI o EUCAST) o remitir la cepa aislada a un centro de referencia. Los puntos de corte epidemiológicos y puntos de corte clínicos del CLSI y del EUCAST pueden sufrir cambios, por lo que se aconseja consultar las actualizaciones de los documentos.

## Conclusiones

La utilidad clínica de los estudios de sensibilidad *in vitro* es la de predecir el éxito/fracaso del tratamiento antifúngico, detectando las cepas aisladas resistentes. Aunque está demostrado que la resistencia *in vitro* en ocasiones pronostica el fracaso terapéutico, hay que tener en cuenta que existen otros factores inherentes al paciente (estado inmunológico, enfermedad de base, etc.) y al antifúngico (dosis administrada y el tiempo que se ha tardado en instaurar el tratamiento) que tienen mucha influencia. Aunque se ha avanzado mucho en los métodos de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos con la actualización de los documentos de referencia (CLSI y EUCAST) y con la introducción de los métodos comerciales, existen aún muchas limitaciones. Por ello se necesitan nuevos métodos más reproducibles y rápidos. En este sentido parece que las nuevas metodologías basadas en la proteómica y en la amplificación de ácidos nucleicos podrían optimizar la detección rápida de resistencias, lo que favorece la eficacia de la terapia antifúngica.

## Conflicto de intereses

Las Dras. Carmen Castro Méndez, Estefanía García Sánchez y Estrella Martín-Mazuelos declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

## Información sobre el suplemento

Este artículo forma parte del suplemento titulado «Programa de Control de Calidad Externo SEIMC. Año 2016», que ha sido patrocinado por Roche, Vircell Microbiologists, Abbott Molecular y Francisco Soria Melguizo, S.A.

## Bibliografía

- Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:931-4.
- Elizabeth MJ, Cavling-Arendrup M. Susceptibility test methods: yeast and filamentous fungi. En: Jorgensen JH, Pfaller A, Carroll KC, et al, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 11.ª edición. ASM Press; 2015;131:2255-85.
- Cantón E, García-Rodríguez J, Martín-Mazuelos E. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:375-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for the development of Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility testing, 1.ª edición. CLSI guideline M57. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4.ª edición. M27-A4. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts M60. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, 2.ª edición. M59. Wayne, PA: CLSI, 2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 3.ª edición. M38. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. CLSI supplement M61. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast, 2.ª edición. CLSI Document M44-A2. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute non dermatophytes filamentous fungi: Approved guideline. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast, 2.ª edición. CLSI Document M51-A. Wayne, PA: CLSI, 2010.
- Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, et al. EUCAST definitive document E. DEF. 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeast. 2017. V. kids 2017.

- Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document E. DEF. 9.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming molds. 2015.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents breakpoint tables for interpretation of MICs. V. 9.0. 2018.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3223-9.
- Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol.* 2014;52:108-14.
- 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.
- Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. Update from the laboratory: clinical identification and susceptibility testing of fungi and trends in antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:13-35.
- Castro C, Serrano MC, Flores B, Espinel-Ingroff A, Martín-Mazuelos E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with a modified NCCLS M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4358-60.
- Pemán J, Valverde A, Martín-Mazuelos E, Serrano MC, Cantón E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and Etest with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:365-70.
- Kidd SE, Halliday CL, Morris AJ. Antifungal susceptibility testing in Australasian clinical laboratories: we must improve our performance. *Pathology.* 2018;50:257-60.
- Siqueira RA, Doi AM, de Petrus Crossara PP, Mariko koga PC, Marques AG, Nunes FG et al. Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek<sup>2</sup>® and Sensititre YeastOne®. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35:83-7.
- Espinel-Ingroff A, Álvarez-Fernández M, Cantón E, Carver PL, Chen SC, Eschenauer G, et al. Multicenter study of epidemiological cutoff values and detection of resistance in *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin using the Sensititre YeastOne colorimetric method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6725-32.
- Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledebauer NA. Multi-center comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1765-71.
- Astvad KM, Perlin DS, Johansen HK, Jensen RH, Arendrup MC. Evaluation of caspofungin susceptibility testing by the new Vitek 2 AST-YS06 yeast card using a unique collection of FKS wild-type and hot spot mutant isolates, including the five most common *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:177-82.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:37-40.
- Cejudo MA, Gallego AG, Lacasa EC, Aller AI, Romero A, Martín-Mazuelos E. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, fluconazole, fluconazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference method. *Med Mycol.* 2010;48:710-9.
- Ramírez M, Serrano MC, Castro C, López E, Almeida C, Martín-Mazuelos E. Comparative study of disc diffusion and microdilution methods in susceptibility testing of micafungin against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:861-3.
- Espinel-Ingroff A, Cantón E, Gibbs D, Wang A. Comparison of Neo.Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and M44-A results for testing susceptibility of *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin itraconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2007;45:858-64.
- Martos AI, Martín-Mazuelos E, Romero A, Serrano C, González T, Almeida C, et al. Evaluation of disk diffusion method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73:53-6.
- Serrano MC, Ramírez M, Morilla D, Valverde A, Chávez M, Martín-Mazuelos E. A comparative study of the disc diffusion method with the broth microdilution and Etest methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:739-42.
- Colosi IA, Faure O, Dessaigne B, Bourdon C, Lebeau B, Colosi HA, et al. Susceptibility of 100 filamentous fungi: comparison of two diffusion methods, Neo-Sensitabs and E-test, for amphotericin B, caspofungin, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol.* 2012;50:378-85.
- Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4387-9.
- Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining posaconazole MICs for 314 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3952-4.

35. Ranque S, Lachaud L, Gari-Toussaint M, Michel-Nguyen A, Mallie M, Gaudart J, et al. Interlaboratory reproducibility of Etest amphotericin B and caspofungin yeast susceptibility testing and comparison with the CLSI method. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2305-9.
36. Cretella D, Barber KE, King ST, Stover KR. Comparison of susceptibility patterns using commercially available susceptibility testing methods performed on prevalent *Candida* spp. *J Med Microbiol.* 2016;65:1445-51.
37. Arendrup MC, Pfaller MA, Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: risk of misclassification of susceptible isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:3965-8.
38. Bourgeois N, Laurens C, Bertout S, Balard Y, Krasteva D, Rispail P, et al. Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida glabrata* by the Etest®, CLSI, and EUCAST methods, and detection of FKS1 and FKS2 mutations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1247-52.
39. Martos AI, Romero A, González MT, González A, Serrano C, Castro C, et al. Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. *Med Mycol.* 2010;48:858-61.
40. Arendrup MC, Perkhof S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3504-11.
41. Caramalho R, Maurer E, Binder U, Araújo R, Dolatabadi S, Lass-Flörl C, et al. Etest cannot be recommended for in vitro susceptibility testing of mucorales. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:3663-5.
42. Espinel-Ingroff A, Arendrup M, Cantón E, Córdoba S, Dannaoui E, García-Rodríguez J. Multicenter Study of Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to Amphotericin B and Echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;61:1792-16.
43. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, Dannaoui E, Garcia-Effron G, Guinea J, et al. Posaconazole MIC distribution for *Aspergillus fumigatus* species complex by four methods: impact of cyp51A mutation on estimation of epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;64:1916-17.
44. Gitman MR, McTaggart L, Spinato LJ, Poopalajah R, Lister E, Husain S, et al. Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. by Using a Composite Correlation Index (CCI)-Based Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Method Appears To Not Offer Benefit over Traditional Broth Microdilution Testing. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2030-4.
45. Buil JB, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJB. Molecular Detection of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Clinical Samples. *Front Microbiol.* 2018;9:515.
46. Ostrosky-Zeichner L, Andes D. The role of *in vitro* susceptibility testing in the management of *Candida* and *Aspergillus*. *J Infect Dis.* 2017;216:S452-7.
47. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadiis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:485-17.
48. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016. Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62:1-50.
49. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(Suppl): e1-38.
50. García-Vidal C, Alastruey-Izquierdo A, Aguilar-Guisado M, Carratalà J, Castro C, Fernández-Ruiz M, et al. Clinical practice guideline for the management of invasive diseases caused by *Aspergillus*: 2018 Update by the GEMICOMED-SEIMC/REIPI. *Enf Infecc Microbiol Clin.* 2018 (en prensa).