

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

45.

**Métodos
microbiológicos para el
diagnóstico, manejo y
estudio de la infección
fúngica invasora**

2 0 1 2

Coordinador: Jesús Vicente Guinea Ortega
Autores: Emilia Cantón Lacasa
Julio García Rodríguez
Jesús Vicente Guinea Ortega
Estrella Martín Mazuelos
Javier Pemán García



INDICE DEL DOCUMENTO CIENTIFICO

1. **Introducción y justificación del procedimiento**
2. **Consideraciones clínicas**
 - 2.1. Candidiasis invasora
 - 2.2. Aspergilosis invasora
 - 2.3. Mucormicosis
 - 2.4. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*
3. **Recogida, transporte y conservación de la muestra**
4. **Manejo de la muestra tras su recepción en el laboratorio de Microbiología**
5. **Diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras (IFIs) por procedimientos independientes del cultivo**
 - 5.1. Detección de antígeno criptocócico
 - 5.1.1. Generalidades
 - 5.1.2. Procesamiento de la muestra
 - 5.1.3. Interpretación de resultados
 - 5.2. Detección de galactomanano (*Platelia Aspergillus*)
 - 5.2.1. Generalidades
 - 5.2.2. Procesamiento de la muestra
 - 5.2.3. Interpretación de resultados
 - 5.3. Detección de mananos de *Candida* spp. y anticuerpos antimanano (*Platelia Candida*) y anticuerpos antimicelio
 - 5.3.1. Generalidades
 - 5.3.2. Procesamiento de la muestra para la detección de manano y anticuerpos antimanano, e interpretación de resultados
 - 5.3.3. Procesamiento de la muestra para la detección de anticuerpos antimicelio (Vircell) e interpretación de resultados
 - 5.4. Detección de beta-1,3-d-glucano
 - 5.4.1. Generalidades
 - 5.4.2. Procesamiento de la muestra
 - 5.4.3. Interpretación de resultados
 - 5.5. Detección de ADN fúngico
 - 5.5.1. Generalidades
 - 5.5.2. Procesamiento de la muestra
 - 5.5.2.1. Muestras del tracto respiratorio inferior
 - 5.5.2.2. Muestras de líquidos ordinariamente estériles
 - 5.5.2.3. Muestras de biopsia fresca o parafinada
 - 5.5.3. Interpretación de resultados
6. **Estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos**
 - 6.1. Introducción y fundamentos de las técnicas de determinación *in vitro* de la sensibilidad antifúngica
 - 6.2. Definiciones
 - 6.3. Métodos de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de levaduras y hongos filamentosos
 - 6.4. Métodos alternativos
 - 6.5. Interpretación de resultados de las técnicas de determinación de la sensibilidad antifúngica
 - 6.6. Limitaciones del método de referencia para levaduras (CLSI, M27-A3)
 - 6.7. Limitaciones del método de referencia para hongos filamentosos (CLSI, M38-A2)
 - 6.8. Patrones de sensibilidad a los antifúngicos de las especies aisladas con mayor frecuencia en las infecciones fúngicas profundas
 - 6.9. ¿Cuándo se deben realizar las pruebas de sensibilidad antifúngica?
 - 6.10. ¿Cuándo se deben utilizar los métodos de referencia para determinar la sensibilidad a los antifúngicos?
 - 6.11. Conclusiones
7. **Monitorización sérica de azoles**
 - 7.1. Introducción y fundamentos
 - 7.2. Recogida de la muestra y transporte al laboratorio y procesamiento
 - 7.3. Interpretación de los resultados

8. Nuevas técnicas para la identificación de hongos y su caracterización genotípica

- 8.1. Aplicación de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) a la micología clínica
 - 8.1.1. Plataformas comerciales disponibles
 - 8.1.2. Preparación de la muestra
 - 8.1.3. Identificación a partir de cultivo sólido
 - 8.1.3.1. Levaduras
 - 8.1.3.2. Hongos filamentosos
 - 8.1.4. Identificación a partir del frasco del hemocultivo
 - 8.1.5. Interpretación de resultados
 - 8.1.6. Mantenimiento y consideraciones finales
- 8.2. Aplicación de la biología molecular a la identificación de hongos causantes de IFIs

9. Bibliografía

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT-MIFI-1. Detección de anticuerpos frente a *Candida* spp.**
- 2. PNT-MIFI-2. Detección de ADN de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas**
- 3. PNT-MIFI-3. Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR**
- 4. PNT-MIFI-4. Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos.**
- 5. PNT-MIFI-5. Identificación de hongos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS**

Procedimientos en Microbiología Clínica

**Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y
Microbiología Clínica**

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

45. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO MANEJO Y ESTUDIO DE LA INFECCIÓN FÚNGICA INVASORA. 2012

Coordinador: Jesús Vicente Guinea Ortega

**Autores: Emilia Cantón Lacasa
Julio García Rodríguez
Jesús Vicente Guinea Ortega
Estrella Martín Mazuelos
Javier Pemán García**

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Los hongos son capaces de causar infecciones muy variadas que van desde afecciones leves superficiales hasta infecciones fúngicas invasoras (IFIs) que afectan a órganos profundos y que comprometen la vida de los pacientes. Las IFIs son las que más interés despiertan ya que se han convertido en un problema para los hospitales modernos. El espectro de enfermos susceptibles de sufrir IFIs graves hospitalarias está aumentando y, por tanto, el número de pacientes en riesgo de desarrollar una IFI es también creciente.

Las IFIs se caracterizan por ser infecciones de difícil diagnóstico, y por presentar una alta mortalidad que no se ha conseguido disminuir a pesar de la introducción en el mercado de nuevos fármacos antifúngicos como los nuevos triazoles y las equinocandinas.

Es frecuente observar a pacientes inmunodeprimidos infectados por hongos como *Candida* spp. o *Aspergillus* spp.; sin embargo, otros pacientes con menores grados de inmunosupresión como aquellos portadores de catéteres intravasculares o enfermos que reciben corticoides por diversas razones son también proclives a padecer IFIs. Por otro lado, hay algunos hongos que son endémicos de algunas áreas geográficas como América del Sur y Norteamérica. Se trata de las micosis regionales o endémicas, producidas por *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, y *Blastomyces dermatitidis*. Estos hongos son capaces de infectar a pacientes con su inmunidad intacta, aunque los cuadros clínicos son más graves en pacientes inmunodeprimidos.

El diagnóstico microbiológico de las IFIs, fundamentalmente de aquellas causadas por *Candida* spp., se basa en el aislamiento de los agentes causales a partir de muestras clínicas del paciente. El cultivo microbiológico presenta limitaciones importantes. Por ejemplo, es lento puesto que es necesario que el hongo sea aislado para poder identificarlo a nivel de especie; supone, en algunas ocasiones, la toma de muestras profundas con el potencial riesgo para el paciente, y presenta una moderada sensibilidad y especificidad. Estas limitaciones explican por qué el diagnóstico basado en técnicas alternativas al cultivo microbiológico está adquiriendo gran protagonismo. La detección de antígenos, anticuerpos o componentes estructurales, fundamentalmente en muestras séricas, son los métodos diagnósticos que mayor interés están cobrando. Entre estas técnicas están los anticuerpos antimicelio, los mananos de *Candida* spp. y los anticuerpos antimanano, y el beta-1,3-d-glucano. La detección de ADN de diversas especies de hongos productoras de IFIs es la gran esperanza del diagnóstico de las IFIs, aunque la falta de estandarización de estas técnicas es aún un factor limitante para recomendar su uso de manera universal.

En los últimos años se han producido avances importantes en la micología médica, fundamentalmente en la aplicación a la misma de la biología molecular. Además de las evidentes aportaciones en el diagnóstico de IFIs, estas técnicas ayudan a conocer de manera precisa las especies de hongos causantes de IFIs, permiten caracterizar genotípicamente aislados de la misma especie, y son de gran ayuda para conocer los mecanismos de resistencia a los antifúngicos. Por otro lado, la identificación de aislados fúngicos a través de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) es una herramienta de utilidad para su aplicación clínica puesto que permite determinar la especie de los hongos productores de IFIs en pocas horas. Incluso existen procedimientos que combinan las técnicas moleculares con la espectrometría de masas que permiten identificar el hongo sin necesidad de su cultivo previo (PCR-ESI MS).

Existen dos procedimientos estandarizados para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de los aislados clínicos productores de IFIs, desarrollados por los comités EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) y el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Ambos comités aportan puntos de corte, fundamentalmente para *Candida* spp., para clasificar a los aislados como sensibles o resistentes. Recientemente el CLSI ha propuesto unos nuevos puntos de corte para fluconazol, voriconazol, y las equinocandinas. Estos puntos de corte son muy similares a los que propuso anteriormente EUCAST.

Los azoles, particularmente voriconazol y posaconazol, son fármacos cuyo uso está muy generalizado. A pesar de sus evidentes ventajas en lo relativo al espectro de actividad, su versatilidad en cuanto a la vía de administración y su eficacia clínica, presentan características farmacocinéticas que hacen imposible predecir los niveles que alcanzan en el suero de los pacientes que los reciben. Esto hecho tiene un importante impacto clínico puesto que se ha observado que los pacientes con niveles subterapéuticos tienen menor probabilidad de responder al tratamiento, mientras que aquellos con niveles elevados están predispuestos a desarrollar toxicidad atribuible al fármaco.

El presente documento se centra esencialmente en las IFIs y completa y complementa la información recogida en el procedimiento de la SEIMC nº 21 titulado "*Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos*" publicado en el año 2006. Se ha considerado interesante actualizar los aspectos novedosos del área y recogerlos en este nuevo procedimiento sin reiterar aspectos ya recogidos en el anterior. Por tanto, es aconsejable la lectura conjunta de este procedimiento con el anterior.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los hongos son patógenos capaces de producir una gran variedad de cuadros clínicos, desde simples

afecciones de los tejidos cutáneos más superficiales (tiñas), hasta infecciones sistémicas graves que ocurren en pacientes inmunocomprometidos y que ponen en riesgo la vida de los mismos (aspergilosis pulmonar invasora). El tipo de infección fúngica va a estar condicionado fundamentalmente por la especie de hongo involucrada, el tipo de paciente infectado (fundamentalmente el grado de inmunosupresión que presente), y la vía a través de la cual se produzca la infección. En el procedimiento nº 21 se mencionaron las infecciones fúngicas más importantes, por lo que no se van a reiterar aquí. Sin embargo, en los últimos años hemos asistido a algunos cambios epidemiológicos en algunas IFIs que requieren una mención especial.

2.1. CANDIDIASIS INVASORA

La candidiasis invasora es la manifestación más grave de la infección por *Candida* spp.. La candidemia, definida como el aislamiento de *Candida* spp. en cultivos de muestras de sangre, es la manifestación más frecuente de la candidiasis invasora. Los pacientes con candidemia tienen una elevada mortalidad. Las principales especies de *Candida* causantes de candidemia son *Candida albicans* (causantes del 50% de los casos), *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, y *Candida* spp. Las diferentes especies de *Candida* presentan marcadas diferencias en lo que respecta a su sensibilidad a los antifúngicos. *C. glabrata* y *C. krusei* son especies con una sensibilidad disminuida a los azoles, mientras que *C. parapsilosis* presenta una sensibilidad menor a las equinocandinas.

El conocimiento de la epidemiología local de especies causantes de candidemia es importante a la hora de instaurar tratamiento antifúngico empírico. Se han demostrado importantes diferencias entre áreas geográficas en lo que respecta a las especies de *Candida* causantes de candidemia. Por ejemplo, *C. glabrata* es una especie especialmente prevalente en países del norte de Europa y Norteamérica. Por el contrario, *C. parapsilosis* es más frecuente en países del sur de Europa y Latinoamérica.

Aunque las vías de adquisición de la infección son diversas, el uso de catéteres intravasculares es a menudo el foco de la infección, y su retirada está recomendada en aquellos casos en los que se sospeche candidemia relacionada con el mismo.

2.2. ASPERGILOSIS INVASORA

Aspergillus spp. es un hongo capaz de causar diferentes afecciones, desde cuadros alérgicos a infecciones invasoras del pulmón u otros órganos profundos. Se trata de un saprófito oportunista ampliamente distribuido por la naturaleza cuyas conidias se diseminan por el aire. La aspergilosis invasora es la infección más grave causada por *Aspergillus* spp.. Se trata de una infección que afecta fundamentalmente al pulmón de los pacientes inmunodeprimidos, que en algunos casos es capaz de migrar a órganos profundos.

El paciente clásico en riesgo de desarrollar aspergilosis pulmonar invasora es el enfermo con neutropenia profunda y prolongada, fundamentalmente causada por el tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer hematológico. Otros pacientes con riesgo de desarrollar la infección eran los receptores de órgano sólido. Hemos asistido a un número creciente de estudios que demuestran que los pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) o la enfermedad granulomatosa crónica predisponen a la infección pulmonar por *Aspergillus* spp.. El uso de corticosteroides en los episodios de exacerbación de la EPOC ha sido responsabilizado de este fenómeno. La aparición de casos de aspergilosis invasora en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos está cobrando un creciente interés. Aunque algunos de estos pacientes presentan cáncer hematológico, un elevado número de pacientes muestran factores predisponentes diferentes como EPOC, uso de corticoides, cirrosis, trasplante de órgano sólido, cirugías mayores, etc. Este aumento en el espectro de pacientes en riesgo de desarrollar la infección obliga al clínico a aumentar el nivel de sospecha de esta infección, sobre todo en lo que respecta a huéspedes con «nuevos factores de riesgo».

La aplicación de la biología molecular a la identificación de los aislados fúngicos está suponiendo una revolución en la taxonomía. Esto es particularmente relevante en los hongos de interés clínico y una de las consecuencias más importantes son los cambios en la nomenclatura de los hongos patógenos. Por ello, es conveniente familiarizarse con dichos cambios. *Aspergillus fumigatus* es la especie responsable de un mayor número de casos de aspergilosis; otras especies de interés clínico son *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus nidulans*. La identificación molecular de los aislados de *Aspergillus* ha demostrado que estas especies son, en realidad, complejos formados por diversas especies genéticamente diferentes pero morfológicamente indistinguibles. Por ello, si sólo se realiza identificación morfológica de los aislados, es conveniente informar al clínico el aislamiento de *Aspergillus fumigatus* complex, *Aspergillus flavus* complex, *Aspergillus terreus* complex, etc. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* complex está compuesto por diferentes especies entre las que destacan *Aspergillus fumigatus* senso stricto, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus novofumigatus*, o *Aspergillus viridinutans*. Las especies del complejo diferentes de *Aspergillus fumigatus* senso stricto se caracterizan por presentar menor susceptibilidad antifúngica a los azoles y la anfotericina B. Otros grupos de hongos, como los Mucorales, están también en la actualidad en revisión taxonómica y se están produciendo cambios en su nomenclatura. Los nuevos triazoles voriconazol y posaconazol son muy activos frente a aislados clínicos y ambientales

de *Aspergillus fumigatus sensu stricto*. En los últimos años hemos asistido a la aparición de cepas de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* con resistencia a los azoles, fundamentalmente en países del norte de Europa. Este problema afecta fundamentalmente a pacientes de Holanda, y se postula que las cepas resistentes se han generado en el ambiente por la presión a la que es sometido el hongo en sus nichos naturales tras el uso extensivo de azoles en agricultura. La hipotética diseminación aérea de las conidias a otras áreas geográficas supone un riesgo que exige la monitorización de la sensibilidad a azoles en cepas de *Aspergillus fumigatus*.

2.3. MUCORMICOSIS

La mucormicosis es una infección causada por hongos Mucorales pertenecientes a diversos géneros. Hay varios factores conocidos que predisponen al desarrollo de mucormicosis. Entre ellos destacan la diabetes, la neutropenia, y los traumatismos. Los pacientes con diabetes mal controlada han sido los principales afectados por esta infección. Sin embargo, datos recientes provenientes de varios países de Europa sugieren un cambio en la epidemiología de la mucormicosis, puesto que en la actualidad los pacientes con mucormicosis y cáncer hematológico superan a aquellos con diabetes. El mejor control de la diabetes y el aumento en el número de pacientes con tumores hematológicos explicaría este cambio. La aplicación de herramientas moleculares para la detección de ADN fúngico ha permitido mejorar el diagnóstico de la mucormicosis, particularmente en aquellas muestras en las que se visualizan hifas aseptadas pero en las que el cultivo es negativo.

2.4. NEUMONÍA POR *Pneumocystis jirovecii*

Pneumocystis jirovecii es un patógeno oportunista humano causante de neumonía en pacientes inmunodeprimidos como aquellos infectados por el VIH o en los receptores de trasplante de órgano sólido. Sin embargo, no es infrecuente encontrar a pacientes inmunocompetentes pero con alguna alteración, como la fibrosis quística, colonizados por este microorganismo. Si bien la detección microscópica de *Pneumocystis jirovecii* en muestras del tracto respiratorio inferior ha sido la base del diagnóstico microbiológico, su baja sensibilidad ha promovido la búsqueda de métodos diagnósticos alternativos. Entre ellos destaca la detección de ADN de *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias mediante PCR o la detección de β -1,3-d-glucano sérico.

3. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La recogida de muestras clínicas es necesaria para poder demostrar la presencia del hongo en las mismas, ya sea por su aislamiento a partir de medios de cultivo, ya sea por la demostración indirecta por la presencia de componentes del hongo como antígenos, ADN, o incluso anticuerpos del propio

paciente. El tipo de muestra clínica dependerá de la sospecha clínica, de los posibles órganos afectados, del tipo de estudio microbiológico que se vaya a realizar sobre ella, y de la posibilidad de tomarla sin que ello comporte un elevado riesgo para el paciente. El transporte de la misma es también importante para asegurar que tanto el hongo viable como los componentes que sean detectables, no se degraden y conduzcan a resultados falsamente negativos.

Los aspectos generales para la recogida correcta y transporte de muestras clínicas fueron tratados y detallados en el procedimiento de la SEIMC nº 21. Con objeto de no reiterar estos contenidos, solamente se mencionan en este documento algunos aspectos adicionales:

1) Los hemocultivos son válidos para el diagnóstico de candidemia, aunque presentan falsos negativos, fundamentalmente en pacientes con candidiasis hepatoesplénica. Las muestras de sangre se deben tomar desde una vía periférica y no a través de una luz del catéter; el aislamiento de *Candida* spp. exclusivamente en una muestra de sangre extraída por la luz del catéter no indica la presencia de candidemia. Para el diagnóstico de la candidemia asociada a catéter no sirven los criterios de hemocultivos diferenciales de tiempo que se aplican en el caso de la bacteriemia asociada a catéter. La toma de muestras superficiales de la piel peri-catéter y de las conexiones del mismo ha demostrado ser útil para el diagnóstico de la bacteriemia relacionada con el catéter. Sin embargo, esto no se puede extrapolar aún al diagnóstico de candidemia relacionada con el catéter. Si el catéter no va a ser retirado y no se puede cultivar, se tienen que realizar hemocultivos de lisis-centrifugación para obtener el diagnóstico.

2) Debe tenerse en cuenta que los hemocultivos son dependientes del volumen de sangre que se inyecta en la botella con el medio de cultivo. Volúmenes reducidos pueden conducir a un resultado falso negativo. Esto se debe tener en cuenta especialmente en los niños, en los que inevitablemente los volúmenes de sangre serán siempre menores a los extraídos en el caso de pacientes adultos. Se recomienda el uso de botellas con medios de hemocultivos especiales para pacientes pediátricos. Es difícil establecer el volumen mínimo de sangre extraída requerido para poder detectar *Candida* spp. en los hemocultivos. Se ha visto que en un 53% y un 68% de los hemocultivos positivos, la carga de *Candida* spp. era de <1 ufc/ml o <5 ufc/ml, respectivamente. *C. glabrata* aparece en menores recuentos y *C. parapsilosis* en mayores. En los pacientes pediátricos con candidemia, las cargas de *Candida* spp. en el hemocultivo son mayores que en el caso de los adultos. En el caso de pacientes adultos, se deben de inocular en las botellas no menos de 8-10 ml de sangre. En el caso de los pacientes pediátricos, se deben de inocular no menos de 1,5 ml de sangre en las botellas especiales.

3) Las infecciones causadas por los hongos filamentosos más frecuentes, como la aspergilosis invasora o la mucormicosis, casi nunca cursan con hemocultivos positivos. Por tanto, la ausencia de crecimiento de *Aspergillus* spp. o Mucorales en hemocultivos no excluye el diagnóstico de estas infecciones. Una excepción a esta regla son las infecciones causadas por *Fusarium* spp. o *Scedosporium* spp.

4) El cultivo de muestras respiratorias está recomendado para el diagnóstico de infecciones pulmonares causadas por hongos filamentosos; sin embargo, el aislamiento de *Candida* spp. a partir de muestras respiratorias no indica la presencia de neumonía causada por este hongo.

5) La determinación de galactomanano se suele ensayar sobre suero o en muestras de lavado broncoalveolar. El envío de muestras de otra naturaleza para la detección de galactomanano debe estar debidamente justificada y en los informes del laboratorio se deben hacer constar las dificultades para poder interpretar los resultados en estos casos.

6) Cualquier muestra clínica es potencialmente adecuada para la detección de ADN fúngico. Sin embargo, las PCR universales que detectan la presencia de cualquier hongo deben aplicarse exclusivamente sobre muestras ordinariamente estériles. Las PCR específicas de especie pueden aplicarse sobre cualquier muestra, en función del hongo buscado.

7) Las muestras recomendadas para la monitorización de azoles en la actualidad son suero o plasma. Dado que no existe un sistema comercial para realizar estas determinaciones, la elección de una u otra depende del laboratorio en el que se realicen las determinaciones.

Todos los aspectos relativos al transporte y conservación de las muestras en el laboratorio ya detallados en el procedimiento de la SEIMC nº 21 siguen vigentes. Como principio general, todas las muestras se deben enviar al laboratorio lo antes posible y con una manipulación lo más aséptica posible, lo que es especialmente importante en aquellos casos en los que se soliciten determinaciones de ADN fúngico. Los hemocultivos se deben insertar en los sistemas de agitación automática lo antes posible. Si no es posible incluirlos tras su recepción en el laboratorio, se deben depositar en una estufa a 37°C hasta entonces. El resto de muestras en las que se solicite cultivo microbiológico para el aislamiento de hongos oportunistas se deben refrigerar a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras en las que se soliciten determinaciones moleculares se deben congelar a -20° hasta su posterior procesamiento.

4. MANEJO DE LA MUESTRA TRAS SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Las muestras clínicas de pacientes con sospecha de micosis se deben manejar con precaución en el laboratorio de microbiología.

El laboratorio debe ser informado de la sospecha de IFI causada por hongos regionales o endémicos, ya que esto obliga al cultivo de las muestras en medios que se deben incubar a diferentes temperaturas (dimorfismo térmico). Además, se debe indicar este hecho en las placas sobre las que se cultiven estas muestras para proteger lo máximo posible al personal del laboratorio de la infección por estos hongos.

Dado que las determinaciones basadas en PCR no están todavía recogidas como criterios diagnósticos de IFI, es necesario que adicionalmente a estas peticiones, se realice el cultivo microbiológico de las mismas. Esto no es aplicable a muestras de suero, que nunca se cultivan. En caso de que la muestra sea muy limitada y se comprometa el resultado del cultivo, se debe dar preferencia al mismo.

5. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS INVASORAS (IFIs) POR PROCEDIMIENTOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

El cultivo microbiológico de muestras clínicas sigue siendo una herramienta ampliamente utilizada para el diagnóstico de IFIs en los laboratorios de microbiología. El cultivo de muestras de sangre es el método de referencia para el diagnóstico de la candidiasis invasora. Además de permitir diagnosticar la enfermedad, el cultivo es necesario para identificar el aislado a nivel de especie y poder determinar la susceptibilidad antifúngica. Los diferentes medios de cultivo disponibles para el aislamiento de hongos fueron detalladamente discutidos en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". Dado que no se han desarrollado nuevos medios de cultivo para el aislamiento de hongos, no se dedica una sección especial a este tema y para más detalles nos referimos al procedimiento anterior.

Es bien sabido que el cultivo micológico presenta limitaciones diagnósticas importantes, fundamentalmente por su baja sensibilidad. Además, en muchas ocasiones, las precarias condiciones de los pacientes con IFIs desaconsejan la obtención de muestras profundas o no permiten esperar el tiempo necesario para el aislamiento y posterior identificación del agente causal. Por ejemplo, el hemocultivo está limitado por su baja sensibilidad, estimada en un 60% para el diagnóstico de candidiasis invasora. Este hecho explica que muchos clínicos se inclinen por usar antifúngicos de forma empírica en pacientes con factores de riesgo para desarrollar una candidiasis invasora y con sospecha clínica. La técnica PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation; AdvanDx, Inc, Woburn, EEAA) permite la identificación de microorganismos visualizados en tinciones microscópicas en unas horas. Es una técnica comúnmente utilizada para detectar microorganismos en secciones histológicas en los

laboratorios de anatomía patológica, pero su aplicación a los laboratorios de microbiología es también posible. Los PNAs se forman a partir de una estructura artificial de poliamida resistente a la degradación por nucleasas y proteasas. Esta estructura forma complejos estables con ADN o ARN complementario. Los PNAs se marcan con una molécula fluorescente que permite identificar el microorganismo visualizado en el hemocultivo en 2,5 horas. Se pueden detectar las especies más importantes del género *Candida* incluyendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, y *C. krusei*, dependiendo del color en el que se visualizan. Aunque este procedimiento no palía la baja sensibilidad del hemocultivo, al menos anticipa su identificación, y su uso ha demostrado disminuir el uso de antifúngicos de amplio espectro.

En el caso de la aspergilosis invasora, el cultivo de muestras respiratorias del tracto respiratorio inferior sigue siendo una práctica utilizada en muchos laboratorios de microbiología, sin embargo es un procedimiento con baja sensibilidad (50%) y baja especificidad. Por último, como se comentó anteriormente, la detección de galactomanano (GM) sérico es útil en pacientes con neutropenia, aunque presenta falsos positivos, y su aplicación en pacientes con factores predisponentes diferentes de la neutropenia es incierta.

Estos hechos hacen necesaria la búsqueda de métodos alternativos al cultivo para realizar un diagnóstico precoz y preciso de las IFIs que pueden proporcionar al clínico información rápida y fiable ante la sospecha de una IFI. Entre estos destacan la detección de antígenos, anticuerpos y componentes fúngicos no antigénicos.

Esta aproximación diagnóstica no es nueva; en 1970 se desarrolló una técnica de látex para la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*, siendo en la actualidad uno de los métodos alternativos más útiles en el diagnóstico de la criptococosis. En otras IFI no ha sido posible desarrollar métodos de detección de antígenos tan eficaces, aunque en los últimos años se han hecho avances importantes.

La mayor parte de métodos alternativos al cultivo se basan en la detección de antígenos fúngicos (antígeno criptocócico, GM de *Aspergillus* y manano de *Candida* spp.), componentes estructurales como el beta-1,3D-glucano (BG), o anticuerpos producidos por el propio paciente (anticuerpos antimanano, o anticuerpos antimicelio).

El procesamiento de la muestra va a depender de la determinación solicitada y de la técnica que se vaya a realizar, por lo que se recomienda seguir fielmente las instrucciones del fabricante, si se trata de un procedimiento comercial.

Todos estos procedimientos diagnósticos tienen también limitaciones y, por el momento, deben ser un complemento al cultivo y no una alternativa. Por ejemplo, contar con la cepa aislada permite determinar la especie causante de la infección y su sensibilidad antifúngica. Además, al igual que ocurre

con el cultivo microbiológico, estas determinaciones deben interpretarse en el contexto clínico de cada paciente de forma individualizada.

5.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCICO

5.1.1. Generalidades. La detección de antígeno capsular de *C. neoformans* es uno de los métodos alternativos al cultivo que ha demostrado una mayor utilidad diagnóstica en el campo de las enfermedades infecciosas. Existen varias técnicas diseñadas y muchas de ellas comercializadas, basadas en su mayoría en técnicas de aglutinación de partículas de látex o en técnicas de ELISA, usando anticuerpos policlonales o monoclonales antiglicuroxilomanano. Es una técnica sensible y específica.

Esta técnica es aplicable en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y también puede ser útil para otras muestras (sangre, orina, y secreciones respiratorias). Es una técnica fácil y rápida, aunque de manera infrecuente puede presentar falsos positivos (factor reumatoide, infecciones por *Trichosporon beigellii*, bacterias y algunas neoplasias, así como la contaminación de la muestra con restos del agar utilizado en los medios de cultivo. Por ello, se recomienda separar una alícuota de la muestra para detección de antígeno criptocócico antes de sembrarla en los medios habituales).

5.1.2. Procesamiento de la muestra. Se deben seguir las instrucciones del fabricante, ya que existen distintos kits. El procedimiento detallado está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 (2005) de "Técnicas rápidas de detección de antígeno" en el PNT-TDA-07, y en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos" en el PNT MIC-10.

5.1.3. Interpretación de resultados. En pacientes con SIDA presenta una sensibilidad cercana al 100% en LCR y del 97% en suero. En este tipo de pacientes se han descrito cepas con poca cápsula siendo por tanto la concentración de antígeno muy baja, disminuyendo la sensibilidad. Un suero positivo >1/4 indica infección y si el título es $\geq 1/8$ indica enfermedad activa. La prueba puede ser positiva antes que el cultivo. A mayor título, mayor gravedad de la enfermedad, y la caída de los títulos indica un buen pronóstico. La cuantificación del título es útil para conocer el pronóstico de la enfermedad, así un título $\geq 1/1.024$, indica un mal pronóstico, con un alto inóculo de levaduras y baja respuesta inmune y una mayor posibilidad de fracaso terapéutico, mientras que si es menor, el pronóstico mejora y el éxito terapéutico aumenta. Tras la aparición de la terapia antirretroviral en los pacientes con SIDA, la criptococosis ha disminuido considerablemente en estos pacientes, y la detección del antígeno capsular, aunque puede ser positiva, se retrasa en el tiempo entre 3 y 6 semanas. Por otra parte, la criptococosis se ha empezado a detectar como una micosis emergente en otras poblaciones,

apareciendo como una infección diseminada, con fiebre y pérdida de peso y alteraciones de conciencia con focalización pulmonar.

En pacientes no infectados por el VIH, la sensibilidad de la detección de antígeno es solo del 75% en LCR y sangre e incluso menor cuando la infección está localizada a nivel pulmonar. Un trabajo reciente sobre criptococosis en pacientes trasplantados de órgano sólido, muestra que un título de antígeno de 1/64 en suero, puede ser diagnóstico. Esta técnica está incluida por la EORT/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer /Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) como criterio diagnóstico de criptococosis.

Los resultados son positivos cuando se observa una aglutinación positiva. Se recomienda una interpretación semicuantitativa de la prueba, utilizando diluciones seriadas de 1/2 al 1/256 para el LCR y de un 1/4 al 1/512 para el suero. Si el resultado da positivo en la última dilución utilizada, se recomienda diluir más la muestra.

Se considera positivo un título $\geq 1/2$ en muestras de LCR y $\geq 1/4$ en suero.

Hay que considerar que existen falsos positivos como se ha expuesto anteriormente.

5.2. DETECCIÓN DE GALACTOMANANO (PLATELIA *Aspergillus*)

5.2.1. Generalidades. El diagnóstico de la aspergilosis invasora (AI) es difícil por la poca especificidad de las manifestaciones clínicas y la inexistencia de hallazgos radiológicos patognomónicos, así como la ausencia de técnicas convencionales de diagnóstico fidedignas. En este sentido, y con el fin de mejorar el diagnóstico de la AI se han desarrollado técnicas que detectan un antígeno específico, el GM. Se trata de un componente de la pared celular de *Aspergillus* spp. que se libera al medio durante el crecimiento del hongo en la invasión tisular. El GM puede detectarse en muestras de suero, lavado broncoalveolar, biopsias, orina y líquidos (pericárdico, cefalorraquídeo y pleural) de pacientes con AI. Existe una técnica comercializada de ELISA (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad) que utiliza un anticuerpo monoclonal EBA-2. Aunque tiene limitaciones, ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de la AI en los últimos años, razón por la cual se ha introducido como criterio micológico en las definiciones de consenso de AI probable de la EORTC/MSG. La determinación del antígeno se hace en suero o plasma y es recomendable hacer determinaciones seriadas (2 determinaciones/semana) para aumentar la especificidad y hacer un diagnóstico precoz.

La validez diagnóstica de la detección de GM depende de la población de pacientes en la que se emplee. Los estudios publicados en pacientes oncohematológicos y receptores de precursores hematopoyéticos han demostrado que la detección de GM tiene una alta especificidad (alrededor del

90%) y una sensibilidad variable entre el 30% y el 100%. La variabilidad en la sensibilidad se ha relacionado con las diferencias en los criterios utilizados para definir los casos de AI, diferencias en los puntos de corte diagnósticos de los índices de GM (con puntos de corte entre 0,5-1,5) y las distintas poblaciones de pacientes incluidos en cada estudio.

Su principal aportación ha sido haber demostrado ser útil en combinación con la tomografía axial computerizada de alta resolución en el diagnóstico precoz de la AI en pacientes de alto riesgo con enfermedades oncohematológicas. En estos casos, la sensibilidad de la técnica supera el 85% y la especificidad el 95%, con valores predictivos de la prueba positivo y negativo superiores a 85 y 95% respectivamente. La detección de GM antecede a los hallazgos clínicos y radiológicos, y podría permitir el comienzo más temprano del tratamiento antifúngico. La sensibilidad disminuye en pacientes con trasplantes de órgano sólido (22%). En otros grupos de pacientes la cuantificación del GM en suero no tiene el mismo valor diagnóstico ni pronóstico. En los enfermos no neutropénicos con AI, la sensibilidad del GM en suero no supera el 50%.

Existen varios estudios que demuestran que la detección de GM en el lavado broncoalveolar de pacientes críticos y receptores de trasplante de órgano sólido puede ser útil en el diagnóstico de la AI. Este hecho también se ha observado en pacientes oncohematológicos con neutropenia, obteniéndose con un punto de corte >1 , una sensibilidad y un valor predictivo positivo que llega al 90% y 75% respectivamente. Los enfermos críticos sin neutropenia presentan una angiоinvasión por *Aspergillus* spp. menor que los pacientes neutropénicos, lo que explicaría la menor utilidad diagnóstica de la detección de GM en suero.

Hay pocos datos de la utilidad de la detección de GM en otras muestras, aunque un resultado positivo de GM en LCR apoya el diagnóstico de aspergilosis del sistema nervioso central, con un punto de corte de $\geq 0,5$ (aunque esto aún está pendiente de validación).

Se ha observado un número importante de falsos positivos en la población pediátrica, sobre todo en neonatos con colonización intestinal por *Bifidobacterium* spp., en pacientes con enfermedad crónica de injerto contra huésped, en alimentados con comida rica en proteínas de soja y otros alimentos, así como en pacientes sometidos a diálisis que tienen problema para clarificar el GM en suero. También se ha descrito una reactividad cruzada con otros hongos (*Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Paecilomyces* spp. y *Cryptococcus* spp.) y fármacos derivados total o parcialmente de estos (piperacilina-tazobactam o amoxicilina-ácido clavulánico). Otra potencial fuente de contaminación exógena de GM son las bolsas con hemoderivados y plaquetas que se usan para las transfusiones.

Los falsos negativos son infrecuentes y se asocian a AI muy localizadas como traqueobronquitis en receptores de trasplante de pulmón, a la especie de

Aspergillus causante de la AI (los pacientes infectados por *Aspergillus fumigatus* tienen concentraciones séricas de GM menores que si están infectados por otras otras especies) o a la profilaxis o al tratamiento empírico con antifúngicos activos frente a *Aspergillus* spp (fundamentalmente, azoles como itraconazol, voriconazol y posaconazol), y a pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

Las muestras adecuadas para estudiar la presencia de GM son el suero y el lavado broncoalveolar.

5.2.2. Procesamiento de la muestra. Para profundizar en aspectos relacionados con la recogida de la muestra y su transporte al laboratorio se recomienda la consulta del Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª (2003) de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", el PNT-RTP-01 y el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 (2006) de "Diagnostico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos" en el PNT MIC-10.

Para aquellos aspectos relativos al procesamiento de la muestra se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. Este proceso está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 (2005) de "Técnicas rápidas de detección de antígeno", en el PNT-TDA-07, y en el Procedimiento en Microbiología clínica de la SEIMC nº 21 (2006) de "Diagnostico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos", en el PNT MIC-10.

5.2.3. Interpretación de resultados. Se considera positiva una determinación de GM sérico $\geq 0,7$ o dos consecutivas de $\geq 0,5$. La EORTC/MSG recomienda hacer determinaciones seriadas (cada 3 o 4 días), ya que la detección de GM $\geq 0,5$ en dos sueros consecutivos aumenta la especificidad y el valor predictivo positivo. La detección de ≥ 1 de GM en el lavado broncoalveolar podría considerarse diagnóstico. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha publicado en 2011 unas recomendaciones de consenso para el diagnóstico precoz de las IFIs que incluyen recomendaciones similares. Además, los datos existentes apuntan a que la detección de GM es también útil para el seguimiento de la evolución de la AI y la respuesta al tratamiento, porque los índices de GM se correlacionan con la carga fúngica en los tejidos. Un aumento de los valores de GM >1 puede ser indicativo de fallo terapéutico o incluso un valor de >2 o la no disminución del GM tras una semana de tratamiento. Sin embargo, pueden observarse aumentos paradójicos de GM en la insuficiencia renal, en los pacientes sometidos a hemodiálisis, así como en pacientes tratados con caspofungina, a pesar de que la respuesta clínica sea favorable.

5.3. DETECCIÓN DE MANANOS DE *Candida* spp. Y ANTICUERPOS ANTIMANANO (PLATELIA *Candida*) Y ANTICUERPOS ANTIMICELIO

5.3.1. Generalidades. Los cultivos de sangre presentan una sensibilidad del 50% para el diagnóstico de la candidiasis invasora. Es por ello que las herramientas diagnósticas serológicas han ido cobrando importancia en el laboratorio de microbiología clínica. Entre estas técnicas destacan la detección de antígeno manano y/o anticuerpos antimanano así como la detección de anticuerpos antimicelio. Hay que recordar que estas dos técnicas diagnósticas son sólo útiles para el diagnóstico de candidiasis invasora y no para otro tipo de IFI.

La detección mediante ELISA de antígeno manano y de anticuerpos frente a este antígeno de *Candida* spp. está disponible comercialmente desde hace años (Platelia *Candida* Ag® y Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak®; Bio-Rad). Pero para evitar el escaso rendimiento de estas técnicas cuando se emplean por separado, se recomienda la realización conjunta de ambas pruebas en todo paciente con sospecha de candidiasis invasora. La detección conjunta de manano y de anticuerpos antimanano se ha demostrado útil en sujetos neutropénicos debido a su elevado valor predictivo negativo (95%).

La presencia de anticuerpos antimanano se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de candidiasis invasora en pacientes neutropénicos, y en muchos pacientes se adelanta a la aparición de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, debido a la alta prevalencia de anticuerpos antimanano en la población sana o colonizada, se han investigado otros anticuerpos más específicos de candidiasis invasora. Entre ellos, destacan los dirigidos frente a antígenos expresados en la fase micelial de *C. albicans* (antimicelio) y frente a los antígenos citoplasmáticos. La detección de anticuerpos antimicelio presenta una sensibilidad (84,4%) y una especificidad (94,7%) elevadas. Además, también permite el seguimiento evolutivo de la infección.

5.3.2. Procesamiento de la muestra para la detección de manano y anticuerpos antimanano, e interpretación de los resultados. Para ello se utiliza una técnica de ELISA que detecta el antígeno manano y los anticuerpos antimanano en muestras de suero. Para la obtención de la muestra y transporte al laboratorio se deben de seguir las siguientes recomendaciones:

1) Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 minutos a 21-25°C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.

2) Envasar y etiquetar adecuadamente.

3) Almacenamiento y transporte de las muestras de suero:

- Procesamiento dentro de las 24 h tras la extracción: refrigerar a 2-8°C.
- Procesamiento en >24 h tras la extracción: congelar a -80°C.

4) No congelar y descongelar innecesariamente.

Es necesario preparar una recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Se calcula la concentración de anticuerpos anti-*Candida* de cada muestra por extrapolación de la densidad óptica en la curva patrón. En cada realización la prueba debe ser validada de acuerdo a las densidades ópticas y rangos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los resultados será la siguiente:

- Resultado positivo: concentración superior a 10 AU (arbitrary units)/ml.
- Resultado intermedio: concentración entre 5 y 10 AU/ml.
- Resultado negativo: concentración inferior a 5 AU/ml.

Los sueros con concentraciones superiores a 20 AU/ml deben diluirse 1:4 con el suero control negativo y volverse a estudiar. La concentración obtenida se multiplicará por cuatro.

La presencia de anticuerpos anti-*Candida* es el resultado de una infección presente o pasada. Una variación importante en el título de anticuerpos anti-*Candida* puede constituir una evidencia de infección activa por *Candida* spp. y debe de confirmarse con los datos clínicos del paciente. Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, ya que su capacidad para producir anticuerpos puede estar disminuida.

Se ha demostrado la existencia de una complementación entre los títulos de anticuerpos antimanano y los títulos de manano, por lo que un suero de un paciente con riesgo de desarrollar una candidiasis invasiva que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos antimanano y viceversa.

5.3.3. Procesamiento de la muestra para la detección de anticuerpos antimicelio (Vircell) e interpretación de los resultados. La prueba es una técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos frente a antígenos del micelio de *C. albicans* en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora.

La existencia de anticuerpos antimanano en la mayoría de las personas hace que casi todos los sueros contengan anticuerpos que reaccionan con la superficie de las fases levaduriforme y micelial de *C. albicans*. Para poder observar la existencia de anticuerpos frente a la fase micelial, el suero debe de absorberse con levaduras de *C. albicans* inviables por calentamiento.

Tras preparar la muestra de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, al observarse al microscopio la fluorescencia puede localizarse en la silueta e interior de los tubos germinales. Esta reactividad recibe la denominación 1. Cuando sólo se ve positiva la silueta del tubo germinal, la reactividad recibe la denominación 0,8. Si la silueta de los tubos germinales es positiva, pero algunos tubos germinales no se definen bien, la reactividad recibe la denominación 0,5. Si se aprecia que los tubos germinales son positivos, pero la reactividad es

muy débil, se denomina 0,2. Finalmente, si ninguno de los tubos germinales presenta fluorescencia la reactividad se denomina 0. El título del suero será la última dilución del suero que registre valores de intensidad de fluorescencia $\geq 0,8$.

Las levaduras no deben de presentar fluorescencia y aparecerán de color rojo. En el caso de que las levaduras presenten fluorescencia, el suero probablemente tiene títulos muy elevados de anticuerpos antimanano y, por tanto, el suero adsorbido la primera vez debe de adsorberse de nuevo y repetirse la prueba. La presencia de anticuerpos antimicelio a un título igual o superior a 160 es compatible con una candidiasis invasora en un paciente inmunocompetente. Títulos inferiores pueden ser significativos en pacientes inmunocomprometidos. Si no se observan tubos germinales fluorescentes la prueba se considera negativa.

Si se van a estudiar varios sueros, se aconseja probar la dilución 1/20 de cada suero y titular posteriormente sólo los que sean positivos a esa dilución.

5.4. DETECCIÓN DE BETA-1,3-D-GLUCANO

5.4.1. Generalidades. El (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano (BG) es un componente de la pared celular fúngica que se libera con el desarrollo de la infección y puede detectarse en el suero de los pacientes con IFI. Su detección no permite un diagnóstico específico porque el BG es un biomarcador panfúngico que se detecta en pacientes que sufren otras IFIs, con la excepción de la mucormicosis y la criptococosis, aunque hay estudios publicados en los que el test podría ser útil en algunos casos de mucormicosis y/o criptococosis.

Existen varias pruebas comercializadas para su detección, pero el Fungitell (Associates of Cape Cod, Inc., EE.UU.) es el utilizado en nuestro país. La detección de BG se realiza mediante una técnica cromogénica muy sensible basada en la activación de la cascada de coagulación del cangrejo herradura japonés. Esta técnica emplea una detección cinética de BG y un punto de corte de 80 pg/ml. Es útil para el diagnóstico de AI en pacientes oncohematológicos con neutropenia, con una sensibilidad del 64% al 88%, una especificidad cercana al 90%, y un valor predictivo positivo y negativo del 70% al 89% y del 73% al 96%, respectivamente. También ha demostrado utilidad en el diagnóstico de otras IFIs, como la candidiasis invasora en pacientes críticos y en neumonías por *Pneumocystis jirovecii*. La detección de BG en suero de pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii* es una herramienta diagnóstica prometedora con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%. La detección de BG precedía en muchos pacientes a la aparición de síntomas y signos clínico-radiológicos y al tratamiento antifúngico empírico.

La detección de BG presenta resultados falsos positivos y negativos que deben tenerse en cuenta para obtener el máximo rendimiento de la prueba.

Debido a su ubicuidad, una de las causas de falsa positividad es la contaminación de los materiales de laboratorio con BG. También se han descrito resultados falsos positivos en pacientes en hemodiálisis con membranas de acetato de celulosa, en contacto con gasas y esponjas quirúrgicas o en tratamientos con inmunoglobulinas humanas intravenosas, polisacáridos antitumorales (lentinano y polisacárido K), albúmina, factores de coagulación, proteínas plasmáticas, quimioterapia antitumoral, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. Los sueros hemolizados, algunas bacteriemias por microorganismos grampositivos (*Streptococcus* spp.) y por gramnegativos (*Alcaligenes* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) y la infección por *Histoplasma capsulatum* son otras causas conocidas de resultados falsos positivos. Los falsos negativos se asocian con la existencia de sueros hiperpigmentados (bilirrubina y triglicéridos elevados), el tratamiento empírico o profilaxis antifúngica y con la especie infectante, ya que no todas liberan la misma cantidad de BG durante la infección.

El tratamiento empírico con antifúngicos no interfiere en la detección del BG. El uso de azitromicina y pentamidina intravenosas puede provocar falsos negativos.

Existen dos metaanálisis publicados recientemente que incluyeron 16 y 15 publicaciones respectivamente evaluando la detección de BG en suero y plasma para el diagnóstico de IFI en pacientes con IFI probada y probable (se excluyeron las IFI posibles). La sensibilidad y especificidad globales fueron del 77% y del 85% respectivamente, mostrando la utilidad de la técnica tanto para el diagnóstico de candidiasis invasora como de AI. Sin embargo, se recomienda realizar otra técnica en paralelo como el GM en el caso de la AI, aumentando así la especificidad a costa de una disminución de la sensibilidad, o la detección de antígenos anticandida en el caso de candidiasis invasora para mejorar la sensibilidad y el valor predictivo positivo.

En base a estos datos, se recomienda la detección del BG en sueros seriados (cada 3 o 4 días) y se ha incluido como criterio micológico de enfermedad fúngica invasora probable en las definiciones de consenso de la EORTC/MSG. El ECIL-3 (*The Third European Conference on Infections in Leukemia*) recomienda también el uso del BG en pacientes con prolongada neutropenia tras quimioterapia para tratamiento de leucemia mieloide aguda o para receptores alogénicos de progenitores hematopoyéticos aunque con menos nivel de evidencia que el GM. La SEIMC ha publicado en 2011 unas recomendaciones de consenso para el diagnóstico precoz de las IFIs que incluyen recomendaciones similares.

5.4.2. Procesamiento de la muestra. La detección de BG está recomendada exclusivamente en muestras de suero.

Las muestras se recogerán según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª (2003) de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología" en el PNT-RTP-01, y en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos" en el PNT MIC-10.

Se deben seguir las recomendaciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 (2005) de "Técnicas rápidas de detección de antígeno" en el PNT-TDA-07, y en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos" en el PNT MIC-10.

5.4.3. Interpretación de resultados

Resultado positivo: valor ≥ 80 pg/ml.

Hay que tener en cuenta los falsos positivos indicados en el texto anterior.

5.5. DETECCIÓN DE ADN FÚNGICO

5.5.1. Generalidades. La introducción de la biología molecular ha supuesto un gran avance en la microbiología clínica. En los últimos años hemos asistido a un amplio desarrollo de técnicas de biología molecular, fundamentalmente aquellas basadas en PCR, aplicadas a diferentes aspectos de la micología. La aplicación más obvia de estas técnicas es su potencial para mejorar y adelantar el diagnóstico de las IFIs, paliando así las limitaciones mencionadas del cultivo microbiológico. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas no se restringe al diagnóstico exclusivamente. Por ejemplo, la identificación molecular a nivel de especie es fundamental para conocer de manera precisa la epidemiología de las especies productoras de IFIs. El genotipado permite conocer la relación genética de varios aislados pertenecientes a la misma especie, lo que resulta importante para el estudio de brotes nosocomiales de IFIs. Por último, gracias a estas técnicas se ha podido avanzar considerablemente en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a antifúngicos

La justificación de la detección de ADN fúngico en una muestra clínica es similar a la de los biomarcadores discutidos en las secciones anteriores. La ventaja de los métodos moleculares es que estos ofrecen no sólo un resultado positivo, sino que además detectan la especie de hongo causante de la infección. Las técnicas moleculares siguen siendo herramientas muy prometedoras, aunque desafortunadamente aún no han conseguido instaurarse en el laboratorio de microbiología por diferentes razones. Entre estas limitaciones cabe destacar el elevado coste de estas técnicas, la necesidad de personal cualificado para su desarrollo, y la falta de estandarización.

Hay diferentes formatos de PCR que pueden ser aplicados al diagnóstico de la IFI. De todas ellas, la más recomendable es la PCR a tiempo real. Este

formato permite cuantificar el ADN presente en la muestra clínica, minimiza el riesgo de contaminaciones cruzadas y por tanto de falsos positivos, y permite el análisis una vez que se ha confirmado la amplificación del ADN (análisis de curvas de *melting*) que puede ser útil para llegar incluso a la identificación a nivel de especie. En el diseño de las PCR se puede optar por una detección universal o panfúngica, o bien por la detección exclusiva de un género concreto o incluso una única especie. Otro aspecto importante es contar con controles internos en la PCR para excluir la posibilidad de inhibiciones y por tanto de falsos negativos.

En los últimos años hemos asistido a la comercialización de algunos sistemas de PCR a tiempo real que permiten la detección de algunas especies de *Candida* y *Aspergillus* (Septifast Roche®), *Aspergillus* spp. o *Pneumocystis jirovecii* (MycAssay Aspergillus, MycAssay Pneumocystis, Myconostica Ltd). Esto supone un paso importante para la instauración de estos sistemas en el ámbito clínico porque aportan estandarización a las técnicas.

5.5.2. Procesamiento de la muestra. En teoría, cualquier muestra clínica es apta para realizar sobre ella una PCR fúngica. Sin embargo, esta afirmación acepta matizaciones. Por ejemplo, no tiene sentido realizar una PCR panfúngica en una muestra que no es ordinariamente estéril (muestra del tracto respiratorio inferior) en la que pueden coexistir comensales habituales (*Candida* spp.) pero en la que se buscan patógenos oportunistas (*Aspergillus* spp.). Por tanto, se debe tener cautela a la hora de realizar las peticiones y a la hora de aceptar en el laboratorio las solicitudes requeridas.

5.5.2.1. Muestras del tracto respiratorio inferior. Se puede realizar una PCR fúngica en muestras respiratorias para la búsqueda de hongos filamentosos oportunistas causantes de neumonía (*Aspergillus* spp., Mucorales, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.). Dada la complejidad y el precio de estas determinaciones, siempre deben de solicitarse bajo justificación clínica.

Pueden aceptarse esputos, broncoaspirados o secreciones respiratorias, muestras de lavado broncoalveolar, o biopsias de cualquier parte del tracto respiratorio. La PCR de *Pneumocystis jirovecii* ha sido validada en muestras de BAL, mostrando resultados de sensibilidad y especificidad del 100% cuando se comparó con la detección microscópica.

Todas las muestras deben cultivarse adicionalmente en medios de cultivo apropiados.

Las muestras con consistencia mucosa deben fluidificarse antes de proceder a la extracción del ADN.

5.5.2.2. Muestras de líquidos ordinariamente estériles. Idealmente, las muestras de sangre completa, suero o plasma, son las ideales para realizar una PCR fúngica. Se trata de muestras fácilmente obtenibles y representativas. La detección de ADN fúngico en muestras de sangre debe ser, en

principio, interpretada como significativa si se descarta una contaminación cruzada de la PCR. Existen multitud de estudios con PCR caseras diseñadas para detectar *Candida* spp. o *Aspergillus*, y en menor medida otros hongos menos frecuentes. El sistema Septifast Roche® está diseñado para ser aplicado sobre muestras de sangre y es capaz de detectar algunas especies de *Candida* y *Aspergillus fumigatus*. Los resultados disponibles con Septifast demuestran que, aplicada en paralelo al hemocultivo, aumenta la rentabilidad de los hemocultivos para el diagnóstico de la candidiasis invasora, pero no se puede recomendar que se sustituya por este. En el caso de la aspergilosis invasora, los datos son esperanzadores dada la negatividad de los hemocultivos en pacientes con aspergilosis pulmonar invasora. La extracción de ADN parece ser un factor limitante a la hora de aumentar la rentabilidad de la PCR fúngica en muestras de sangre.

Los datos en otro tipo de líquidos son muy escasos.

5.5.2.3. Muestras de biopsia fresca o parafinada. La PCR fúngica universal tiene buena rentabilidad cuando se aplica sobre biopsias de tejido. Esta técnica tiene especialmente interés en muestras en las que el cultivo micológico resulta negativo y el examen histopatológico muestra la presencia de elementos compatibles con estructuras micóticas. Esto último suele ocurrir con biopsias que contienen Mucorales y no han sido debidamente procesadas, por lo que la amplificación de ácidos nucleicos es la única forma de obtener un diagnóstico etiológico. Sobre estas muestras se puede realizar una PCR panfúngica que permite determinar si existe un hongo en la muestra. En caso de resultar positiva, se puede secuenciar el producto amplificado para determinar la especie detectada. También se puede realizar la PCR si la muestra se encuentra en formol y parafinada. En este caso se debe de extraer el ADN con un protocolo específico para muestras parafinadas. Se debe tener en cuenta que la rentabilidad de la PCR es menor en muestras parafinadas porque el ADN se degrada lo que se puede traducir en falsos negativos.

5.5.3. Interpretación de resultados. Como se ha comentado, la detección de ADN fúngico no es un criterio de diagnóstico de IFI aceptado por la EORTC, por lo que la evaluación de los resultados de la aplicación de estas técnicas se debe interpretar con precaución. La PCR puede ayudar a anticipar los resultados, y puede tener valor diagnóstico cuando los resultados son compatibles con el contexto clínico del paciente. Los resultados de Septifast son esperanzadores pero aún se necesitan más estudios.

6. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIFÚNGICOS

6.1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos pero son similares en su diseño y ejecución y se realizan por los mismos motivos, como son: 1) conocer la actividad *in vitro* de los antifúngicos, 2) predecir el resultado terapéutico de un determinado tratamiento antifúngico, 3) controlar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible, 4) correlacionar la actividad *in vitro* con los resultados *in vivo*, y 5) determinar la utilidad terapéutica de los nuevos antifúngicos.

El principal fundamento de las pruebas de sensibilidad *in vitro* es detectar los aislados resistentes entre la población sensible o el desarrollo de resistencia durante el tratamiento. Para ello se necesitan métodos de sensibilidad reproducibles y disponer de puntos de corte clínicos para interpretar sus resultados. El CLSI (antes NCCLS, *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) y el EUCAST han desarrollado métodos reproducibles para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras, hongos filamentosos y dermatofitos. También han definido los puntos de corte clínicos (según CLSI y EUCAST) y los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF, según EUCAST) para interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

6.2. DEFINICIONES

- Concentración mínima inhibitoria (CMI): es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del microorganismo.

- Concentración mínima efectiva (CME): es la concentración más baja de candina que produce un cambio morfológico (colonias pequeñas, redondeadas y compactas, en lugar de hifas). Se utiliza para definir la actividad de las candidas sobre hongos filamentosos.

- Puntos de corte clínicos (“clinical breakpoints” [CBP]): clasifican los aislados en clínicamente sensibles o clínicamente resistentes. Se establecen basándose en la correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* con la eficacia terapéutica, distribución de las CMIs, parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) y mecanismos de resistencia del antifúngico.

- Puntos de corte epidemiológicos (“epidemiological cutoff value” [ECOFF]): concentración más elevada que separa la población salvaje (sin ningún mecanismo de resistencia) de los aislados con algún mecanismo de resistencia, no pertenecientes a la población salvaje. Los aislados inhibidos con CMI superiores al ECOFF se clasifican como aislados 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, distribución de las CMI, teniendo en cuenta la variabilidad inherente a la técnica, y debe incluir al menos el 95% de la población.

- Población salvaje (*wild type* [WT]): para una especie determinada, un aislado se define como perteneciente a la población salvaje por la ausencia de mutación adquirida o de mecanismos de resistencia. Los aislados se clasifican como pertenecientes a la población salvaje si la CMI del antifúngico en cuestión es menor o igual al ECOFF. Si la CMI es mayor que el ECOFF se dice que el aislado no pertenece a la población salvaje (*non-WT*).

Los aislados solo se pueden clasificar como resistentes a un antifúngico cuando se ha determinado el punto de corte clínico.

6.3. MÉTODOS DE REFERENCIA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS

El CLSI ha estandarizado dos métodos para determinar la sensibilidad a los antifúngicos: el método de microdilución en caldo para levaduras (documento M27-A3) y para hongos filamentosos y dermatofitos (documento M38-A2), y el método de difusión en agar para levaduras (documentos M44-A2 y M44-S2) y hongos filamentosos no dermatofitos (documentos M51-A y M51-S1). El EUCAST también ha estandarizado un método de microdilución para levaduras (documento EDef 7.1) y para hongos filamentosos (documento E.DEF 9.1).

Los métodos del CLSI y del EUCAST son muy similares; difieren en la concentración de glucosa del medio de cultivo, forma del fondo de la microplaca, inóculo, tipo de lectura y tiempo de incubación, pero los resultados obtenidos por ambos métodos son muy 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; además, siempre se debe incluir una cepa control de calidad ya que sus resultados confirman la validez del ensayo.

Los métodos de dilución estandarizados son muy laboriosos para utilizarlos en la rutina diaria del laboratorio. En la actualidad ya se dispone de métodos estandarizados de difusión en disco (M44-A y M51-P) más baratos y sencillos de realizar. No obstante ante un aislado resistente por el método de difusión debe confirmarse por el método estandarizado de dilución.

6.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Entre los diferentes métodos comercializados destacan: Sensititre YeastOne, VITEK 2, Etest y Neo-Sensitab por ser los más utilizados. Para más información sobre la correlación de los métodos comerciales con los de métodos de referencia consultar las referencias bibliográficas.

6.5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Según el valor de la CMI las cepas se clasifican en sensibles, intermedias, sensibles dependiendo de la dosis administrada (S-DD) y resistentes. La categoría S-DD no se incluye en las bacterias, se ha establecido en función de la dosis de antifúngico administrada y para los antifúngicos fluconazol e itraconazol exclusivamente. En la Tabla 1 se especifican los puntos de corte clínicos del CLSI y del EUCAST para *Candida* spp. y en la Tabla 2 para *Aspergillus* spp. por el método de microdilución.

Para anfotericina B y posaconazol todavía no se han establecido puntos de corte clínicos. Para anfotericina B, en la práctica clínica, y basándose en los datos epidemiológicos, se consideran sensibles los aislados para los que la CMI del antifúngico es ≤ 1 mg/L y para posaconazol el punto de corte epidemiológico es especie-específico (Tabla 1).

Debe tenerse en cuenta que en la evolución de las micosis invasoras influyen muchos factores inherentes al propio enfermo, como son el estado inmunológico, la enfermedad de base, el antifúngico y dosis del mismo administrada, tiempo que se ha tardado en instaurar el tratamiento, etc. Por tanto, el fracaso terapéutico, no siempre es imputable al antifúngico. El hecho de que el aislado sea sensible al antifúngico no asegura que haya una respuesta favorable al tratamiento, ya que, además de la sensibilidad al antifúngico, la respuesta depende de los factores del huésped y del tiempo que se ha tardado en instaurar el mismo. No obstante, con los estudios de correlación *in vitro-in vivo*, se ha comprobado que la probabilidad de obtener un fracaso terapéutico es muy elevada cuando el aislado es resistente al antifúngico.

A diferencia de las infecciones bacterianas para las que se dispone de numerosos antibacterianos para su tratamiento, el número de antifúngicos sistémicos es muy limitado por lo que ante una fiebre mantenida en enfermos con micosis sistémica antes de sustituir el antifúngico es conveniente comprobar si el fracaso terapéutico se debe a una resistencia al antifúngico del microorganismo causante de la infección o a otras causas inherentes a la complejidad del proceso infeccioso (inmunosupresión, farmacocinética inadecuada, etc.). Por lo tanto, esta es una de las principales indicaciones para realizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

6.6. LIMITACIONES DEL MÉTODO DE REFERENCIA PARA LEVADURAS (CLSI, M27-A3)

a. El método ha sido descrito únicamente para determinar la sensibilidad de *Candida* spp. y *C. neoformans*. Puede aplicarse a otras levaduras con la excepción de *Malassezia furfur* debido a sus especiales requerimientos nutricionales.

b. Los puntos de corte son aplicables a los antifúngicos sistémicos. Por lo tanto no se han de aplicar a los antifúngicos administrados por otras vías (por ejemplo, vía tópica, inhalatoria).

c. La lectura de los resultados es difícil y requiere personal entrenado.

d. No identifica los aislados resistentes a anfotericina B.

e. Carece de puntos de corte clínicos para anfotericina B y posaconazol.

6.7. LIMITACIONES DEL MÉTODO DE REFERENCIA PARA HONGOS FILAMENTOSOS (CLSI, M38-A2)

Los puntos de corte son epidemiológicos y no clínicos; por lo tanto, los hongos filamentosos solo se pueden clasificar como sensibles o con sensibilidad reducida al antifúngico.

6.8. PATRONES DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS DE LAS ESPECIES AISLADAS CON MAYOR FRECUENCIA EN LAS INFECCIONES FÚNGICAS PROFUNDAS

En general, los aislados de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, son sensibles a los azoles, aunque en *C. albicans* se han descrito algunos aislados resistentes (2%). Entre los aislados de *C. tropicalis* y *C. glabrata*, es frecuente la resistencia a los azoles comercializados (fluconazol y/o itraconazol) y *C. krusei* es intrínsecamente resistente a fluconazol. Los nuevos triazoles (voriconazol y posaconazol) son activos sobre los aislados intrínsecamente resistentes a fluconazol (*Candida krusei*, *Candida novergensis* y *Candida inconspicua*). Voriconazol (antifúngico derivado del fluconazol) en general es activo sobre los aislados resistentes a fluconazol; no hay una resistencia cruzada completa entre fluconazol y voriconazol, aunque las CMIs de voriconazol para los aislados resistentes a fluconazol son ligeramente más elevadas que las de los sensibles a fluconazol. Posaconazol (antifúngico derivado de itraconazol) tiene resistencia cruzada con itraconazol. Todos los aislados con CMIs de posaconazol elevada son resistentes a itraconazol pero lo contrario no siempre se cumple. Las candidinas (casporfungina, micafungina y anidulafungina) son poco activas sobre *C. parapsilosis* y *Candida guilliermondii* y no tienen actividad sobre *C. neoformans*.

En las especies *C. krusei*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, y *Trichosporon beigelii* se pueden encontrar aislados con CMI de anfotericina B > 1 mg/L.

Hasta la fecha no se ha observado resistencia cruzada entre azoles y candidinas ni entre anfotericina B y candidinas.

En los hongos filamentosos, se han descrito aislados de *Aspergillus fumigatus* resistentes a itraconazol, voriconazol, posaconazol y/o anfotericina B. Los aislados de *A. terreus*, *Fusarium solani* y *Scedosporium prolificans* son intrínsecamente resistentes a anfotericina B. Además, *Fusarium* spp. y los mucorales son intrínsecamente resistentes a las candidinas. Posaconazol y anfotericina B son los únicos antifúngicos que tienen actividad sobre los mucorales.

Tabla 1. Puntos de corte especie-específicos propuestos al CLSI para cada especie y por el EUCAST

Especie	Antifúngico	ECOFF	Puntos de corte clínicos (CMI en mg/L)					
			CLSI			EUCAST		
			S	I	R	S	I	R
<i>C. albicans</i>	Anidulafungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5	≤0,03		>0,03
	Caspofungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5			
	Micafungina	0,03	≤0,25	0,5	>0,5			
	Fluconazol	0,5	≤2	4	>4	≤2	4	>4
	Itraconazol	0,12	≤0,12	0,25-0,5	>0,5			
	Posaconazol	0,06				≤0,06		>0,06
	Voriconazol	0,03	≤1	2	>2	≤0,12		>0,12
	Anfotericina B	2				≤1		>1
	5 flucitosina	0,5						
<i>C. parapsilosis</i> complex	Anidulafungina	4	≤2	4	>4	NAT		
	Caspofungina	1	≤2	4	>4			
	Micafungina	4	≤2	4	>4			
	Fluconazol	2	≤2	4	>4	≤2	4	>4
	Itraconazol	0,5	≤0,12	0,25-0,5				
	Posaconazol	0,25				≤0,06		>0,06
	Voriconazol	0,12	≤1	2	>2	≤0,12		>0,12
	Anfotericina B	2				≤1		>1
	5 flucitosina	0,5						
<i>C. tropicalis</i>	Anidulafungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5	≤0,06		>0,06
	Caspofungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5			
	Micafungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5			
	Fluconazol	2/2	≤2	4	>4	≤2	4	>4
	Itraconazol	0,5	≤0,12	0,25-0,5	>0,5			
	Posaconazol	0,12				≤0,06		>0,06
	Voriconazol	0,06	≤1	2	>2	≤0,12		>0,12
	Anfotericina B	2				≤1		>1
	5 flucitosina	0,5						
<i>C. grabrata</i>	Anidulafungina	0,25	≤0,12	0,25	>0,25	≤0,06		>0,06
	Caspofungina	0,12	≤0,12	0,25	>0,25			
	Micafungina	0,03	≤0,03	0,12	>0,12			
	Fluconazol	32		≤32	>32	NAT		
	Itraconazol	2	≤0,12	0,25-0,5				
	Posaconazol	2/4						
	Voriconazol	0,5/1	≤1	2	>2			>1
	Anfotericina B	2				≤1		>1
	5 flucitosina	0,5						
<i>C. krusei</i>	Anidulafungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5	≤0,06		>0,06
	Caspofungina	0,25	≤0,25	0,5	>0,5			
	Micafungina	0,12	≤0,25	0,5	>0,5			
	Fluconazol	64						
	Itraconazol	1	≤0,12	0,25-0,5	>0,5			
	Posaconazol	0,5/1						
	Voriconazol	0,5/1	≤1	2	>2			
	Anfotericina B	2				≤1		>1
	5 flucitosina	32						
<i>C. guilliermondii</i>	Anidulafungina	4	≤2	4	>4			
	Caspofungina	2	≤2	4	>4			

Micafungina	2	≤2	4	>4
Fluconazol	8			
Itraconazol	1			
Posaconazol	0,5			
Voriconazol	0,25			
Anfotericina B	2			
5 flucitosina	1			

www.eucast.org (Versión: V 4,1, Datos válidos desde 5/3/2012)

NAT: no adecuado para tratamiento.

Tabla 2. Puntos de corte epidemiológicos para *Aspergillus* spp, por los métodos CLSI y EUCAST y puntos de corte del EUCAST (CMI en mg/L)

Especie	Antifungico	Puntos de corte epidemiológicos (ECOFF)		Puntos de corte clínicos (EUCAST)*	
		CLSI	EUCAST	S	R
<i>A. flavus</i>	Anfotericina B	2	4		
	Caspofungina	0,25			
	Posaconazol	0,25	0,5		
	Voriconazol	1			
	Itraconazol	1	1	≤1	>2
<i>A. fumigatus</i>	Anfotericina B	2	1	≤1	>2
	Caspofungina	0,5			
	Posaconazol	0,5	0,25	≤0,12	>0,25
	Voriconazol	1			
	Itraconazol	1	1	≤1	>2
<i>A. nidulans</i>	Anfotericina B	4			
	Caspofungina	0,5			
	Posaconazol	1	0,5		
	Voriconazol	2			
	Itraconazol	1	1	≤1	>2
<i>A. niger</i>	Anfotericina B	2	1	≤1	>2
	Caspofungina	0,25			
	Posaconazol	0,5	0,5		
	Voriconazol	2			
	Itraconazol	1	4		
<i>A. terreus</i>	Anfotericina B	4	4		
	Caspofungina	0,25			
	Posaconazol	0,5	0,25	≤0,12	>0,25
	Voriconazol	1			
	Itraconazol	1	1	≤1	>2
<i>A. versicolor</i>	Anfotericina B	2			
	Caspofungina	0,25			
	Posaconazol	1			
	Voriconazol	2			
	Itraconazol	2			

*www.eucast.org (Versión: V 4,1, Datos validos desde 5/3/2012)

6.9. ¿CUÁNDO SE DEBEN REALIZAR LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA?

El mejor test de sensibilidad es una correcta identificación del microorganismo causante de la infección. Conociendo la especie se puede predecir su sensibilidad por los datos epidemiológicos de los que se dispone.

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos deben realizarse en:

- Todas las micosis invasoras.
- Las micosis orofaríngeas y mucofaríngeas que no responden al tratamiento.
- En las micosis producidas por patógenos emergentes en las que no se dispone de datos previos de su sensibilidad.
- Ante cualquier tipo de micosis que no responda al tratamiento administrado.
- Cuando se quiere conocer la prevalencia de cepas resistentes en el hospital.
- En estudios epidemiológicos.

6.10. ¿CUÁNDO SE DEBEN UTILIZAR LOS MÉTODOS DE REFERENCIA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS?

Los métodos de referencia son laboriosos y deben realizarse por personal experimentado, no obstante se deben utilizar en determinadas circunstancias como son:

- En los estudios epidemiológicos.
- Para confirmar los aislados resistentes obtenidos 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.

6.11. CONCLUSIONES

La utilidad clínica de los valores de la CMI es la de predecir el resultado del tratamiento antifúngico. Sin embargo, los ensayos de sensibilidad *in vitro* no siempre predicen el éxito terapéutico ya que otros factores inherentes al paciente como son el estado inmunológico, enfermedad de base, etc. tienen mucha influencia. En cambio, la resistencia *in vitro* a menudo predice el fracaso terapéutico. Los puntos de corte clínicos se han determinado correlacionando la CMI del antifúngico con el resultado terapéutico, teniendo en cuenta la farmacocinética, farmacodinamia, dosis y mecanismos de resistencia del antifúngico y cumplen la regla "90-60", según la cual las infecciones debidas a aislados sensibles al antifúngico el 90% responden al tratamiento mientras que si es resistente responden aproximadamente el 60% de las veces.

Ante un aislado resistente al antifúngico por cualquiera de los métodos de sensibilidad, se recomienda comprobar la identificación de la especie aislada, la pureza del cultivo y repetir el test de

sensibilidad utilizando el método de referencia de dilución o remitir el aislado a un centro de referencia.

Los puntos de corte epidemiológicos y puntos de corte clínicos del CLSI y del EUCAST pueden sufrir cambios, se aconseja consultar actualizaciones de los documentos.

7. MONITORIZACIÓN SÉRICA DE AZOLES

7.1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS

Los azoles son fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento y la prevención de IFIs. Fluconazol presenta un perfil farmacocinético favorable y sus niveles séricos son predecibles. Esto significa que conociendo la dosis administrada se puede conocer el área bajo la curva (AUC) del fármaco. Esto mismo no puede suscribirse para el caso de itraconazol, voriconazol y posaconazol.

Itraconazol se puede administrar por vía oral o intravenosa, y las formas orales presentan problemas de absorción del fármaco. Itraconazol presenta una farmacocinética no lineal y numerosas interacciones medicamentosas a nivel hepático.

Voriconazol se puede administrar por vía oral o intravenosa. Presenta una farmacocinética no lineal, lo que se traduce en cambios desproporcionados en la exposición al fármaco tras alteraciones en la dosificación. Además, voriconazol se metaboliza principalmente por el citocromo CYP2C19, que presenta un considerable polimorfismo (metabolizadores lentos y rápidos). Todo ello explica que no se pueda predecir la exposición al fármaco tan sólo teniendo en cuenta la dosis administrada.

Posaconazol se puede administrar exclusivamente por vía oral. A diferencia de itraconazol y voriconazol, posaconazol presenta una farmacocinética lineal con dosis entre 50-800 mg; sin embargo, la absorción se satura con dosis superiores a 800 mg diarios. La exposición sistémica al fármaco aumenta tras la administración en dosis divididas. El problema de posaconazol es su absorción intestinal. La recomendación de la monitorización de niveles séricos de posaconazol no es tan evidente como en el caso de itraconazol y voriconazol. Aunque parece haber una relación entre los niveles séricos elevados y una mayor respuesta terapéutica, no está claro cuál es el nivel a partir del cual disminuye la probabilidad de éxito terapéutico.

El objetivo de la monitorización sérica de azoles es aumentar las posibilidades de éxito terapéutico y minimizar la aparición de efectos adversos atribuibles al fármaco.

De todos los procedimientos para realizar la monitorización sérica, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es el deseable. Esta técnica presenta buena sensibilidad y además es reproducible.

7.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA Y TRANSPORTE AL LABORATORIO Y PROCESAMIENTO

Es recomendable que se monitoricen los niveles séricos de itraconazol, voriconazol, y posaconazol en

todos los pacientes que reciban estos fármacos. La muestra se debe de tomar tras 5-7 días tras el inicio de la terapia antifúngica que es cuando se alcanza el estado de equilibrio estacionario. La periodicidad de toma de muestras adicionales no está clara, aunque se debe volver a solicitar la monitorización cuando no haya respuesta terapéutica, o cuando se pase de la vía intravenosa a la oral.

Se debe de tomar la muestra de suero justo antes de administrar la siguiente dosis del fármaco (valle). La muestra debe ser enviada al laboratorio de microbiología lo antes posible, y una vez allí debe de separarse el suero del coágulo y mantenerse refrigerada a 4°C hasta su procesamiento.

7.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Monitorización de itraconazol:

- Niveles séricos en valle mayores a 6 mg/L aumentan las probabilidades de éxito terapéutico
- No existe una clara correlación entre niveles elevados y aparición de efectos adversos.

Monitorización de voriconazol:

- Niveles séricos en valle menores a 1 µg/ml conducen a una menor probabilidad de éxito terapéutico
- Niveles séricos superiores a 5 µg/ml conducen a una mayor probabilidad de aparición de efectos tóxicos, fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central y hepático

Monitorización de posaconazol:

- Niveles séricos en valle superiores a 1,25-1,5 µg/ml conducen a una mayor probabilidad de éxito terapéutico
- No se ha establecido una relación entre niveles séricos elevados y la aparición de efectos adversos.

8. NUEVAS TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y SU CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

8.1. APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF MS) A LA MICOLOGÍA CLÍNICA

La espectrometría de masas basada en la ionización y desorción suave mediante una matriz por láser y espectrometría con tiempo de vuelo (*soft ionization Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) ha irrumpido con gran éxito en la identificación microbiana en los servicios de microbiología clínica. El principio del sistema parte de una mezcla sobre una superficie metálica de la muestra a estudiar con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA). Ambas cocristalizan cuando se evapora el solvente de la matriz. Se somete a un bombardeo con láser que provoca una ionización de algunos componentes de la muestra, principalmente proteínas, y una desorción de las moléculas ionizadas que pasan de fase sólida a fase gaseosa. Estas moléculas son impulsadas por un campo eléctrico a una columna de ultravacío moviéndose hacia el polo opuesto en el que se encuentra un detector. En el campo eléctrico los iones sufren una

aceleración inversamente proporcional a su masa y por tanto el tiempo que tardan en recorrer el tubo (tiempo de vuelo) será mayor cuanto mayor sea su masa (a igualdad de cargas) o su relación masa/carga. El detector expresará los resultados en forma de intensidad de picos por masa/carga o intensidad por tiempo. Estos picos crean un espectro que traduce el perfil proteico (fundamentalmente riboproteico) del microorganismo estudiado. Estos perfiles son exclusivos de cada especie, y se comparan con una librería que tiene el *software* del sistema. La comparación se formula mediante una escala de similitud (*score*) de la muestra estudiada con la librería de referencia lo que indicará el grado de fiabilidad de la identificación obtenida.

8.1.1. Plataformas comerciales disponibles.

Aunque hay comercializadas tres plataformas, son dos sistemas de MALDI-TOF MS comercializados los que más se han utilizado en la identificación fúngica: MALDI-Biotyper (Brüker-Daltonics) y VITEK MS AXIMA-SARAMIS (BioMerieux). Las diferencias entre ambos ya se comentaron ampliamente en el procedimiento de la SEIMC nº 37 (2010) de "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología".

8.1.2. Preparación de la muestra. El procedimiento de MALDI-TOF MS es muy sencillo y consiste en depositar directamente la colonia sobre el pocillo correspondiente del soporte sólido, después se le añade la matriz. Sin embargo, los hongos tienen una pared muy rígida que primero hay que romper, lo que complica ligeramente el método inicial, añadiendo un paso previo de extracción proteica para poder realizar la espectrometría con garantías de éxito. De igual manera, el sistema MALDI-TOF MS puede identificar satisfactoriamente levaduras directamente a partir de un hemocultivo crecido. No obstante, el protocolo es diferente ya que a la extracción requerida, hay que añadir una serie de lavados previos para eliminar la masa celular sanguínea que interferiría con el análisis.

8.1.3. Identificación a partir de cultivo sólido.

Aunque a priori el procesamiento de levaduras y hongos filamentosos es el mismo, las características peculiares de las distintas colonias aconsejan una descripción específica para cada tipo:

8.1.3.1. Levaduras. Los espectros obtenidos podrían variar según el medio de cultivo empleado, aunque los fabricantes no establecen recomendaciones concretas. Además, muchos estudios utilizan medios diferentes y esto no parece alterar el rendimiento del sistema. Se recomienda, no obstante, partir de un cultivo fresco (24-48 h) y puro. Para ello, los medios cromogénicos pueden aportar alguna ventaja adicional.

Los dos sistemas (MALDI Biotyper y VITEK MS) recomiendan protocolos similares con algunas pequeñas diferencias:

- *Microflex*. La técnica de extracción más descrita consiste en la suspensión de la levadura en 300 µl de agua destilada químicamente pura,

posteriormente añadir 900 µl de etanol absoluto, mezclar la muestra y centrifugar a 13,000 rpm 2 minutos. Se decanta el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Posteriormente, se deja secar el pellet para que todo el etanol de la muestra se evapore. Una vez seco, se añade un volumen de ácido fórmico 70% y acetonitrilo por volumen de pellet. Todo ello se vuelve a centrifugar 2 minutos, y se toma 1 µl de sobrenadante que se depositará en un pocillo de la placa. Una vez seco el pocillo se cubrirá con 1 µl de matriz. Cuando se vuelva a secar, la muestra estará lista para la espectrometría de masas. Aunque la técnica puede funcionar cuando se coloca directamente la levadura sobre el pocillo de forma análoga a como se hace con las bacterias, en general el rendimiento es sensiblemente menor, por lo que se desaconseja el método directo de manera rutinaria. Otros autores han modificado este protocolo para hacerlo más sencillo con buenos resultados. Consiste en la colocación en el pocillo de una porción de la colonia. Una vez seco se añade un microlitro de ácido fórmico al 70%. Cuando se vuelve a secar se añade la matriz y una vez cristalizada, ya está listo para su análisis.

- **VITEK MS.** El protocolo hasta ahora recomendado por BioMérieux, consiste en la extracción directamente en el pocillo de la placa colocando la colonia y añadiendo ácido fórmico al 70% sobre ella. Una vez seco se deposita 1 µl de matriz y cuando ésta co-cristaliza, se puede realizar la espectrometría.

8.1.3.2. Hongos filamentosos. El estudio de los hongos filamentosos no tiene ningún requisito adicional. La obtención del micelio para el procedimiento de extracción se puede realizar sin dificultad raspando directamente la colonia o cortando una porción de agar que contenga la colonia. Posteriormente se someterá al tratamiento con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo igual que en el procedimiento para levaduras. Se recomienda no obstante que la colonia esté suficientemente esporulada para poder obtener un mayor número de conidias además de otros elementos miceliarios. Existen también protocolos más abreviados que directamente colocan parte del micelio sobre el pocillo y antes de poner la matriz, dispensan etanol o ácido fórmico, con resultados satisfactorios.

La experiencia en la identificación de hongos filamentosos mediante el sistema VITEK MS es menor, no obstante la documentación interna de BioMérieux recomienda el siguiente protocolo: 1. Suspensión de la colonia en 50 µl de ácido trifluoroacético; 2. Agitar mediante vórtex; 3. Adición de 450 µl de agua desionizada y desmineralizada; 4. Esperar 30 minutos; 5. Colocar en el pocillo y añadir la matriz.

8.1.4. Identificación a partir del frasco del hemocultivo. La identificación de levaduras directamente a partir de un frasco de hemocultivo

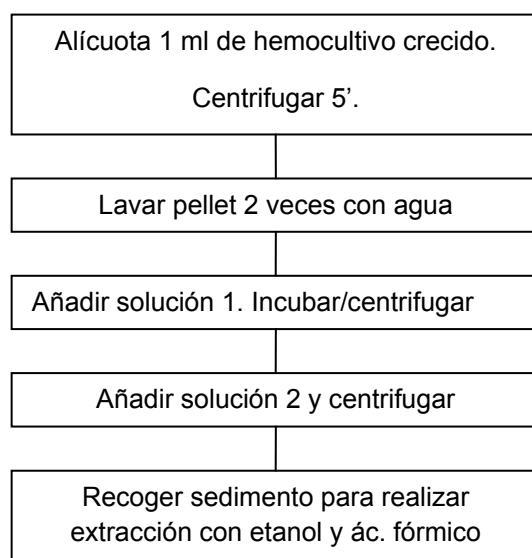
crecido es una ventaja que el sistema ofrece, adelantando en 24-48 h la identificación, lo que puede repercutir directamente en una adecuación más precoz del tratamiento antifúngico. Hay que tener en cuenta que no todos los medios de cultivo son igualmente útiles ya que aquellos que contienen partículas de carbón pueden afectar negativamente el rendimiento de la técnica. Los resultados obtenidos con otros medios de hemocultivo, ofrecen resultados muy satisfactorios con identificaciones por encima del 90% de los casos de especies más frecuentes. El sistema MALDI- MS Biotyper de Brüker ha modificado recientemente sus protocolos de identificación sobre hemocultivo utilizando el kit MALDI Sepsityper con unos resultados excelentes (Figura 1).

8.1.5. Interpretación de resultados. El *software* de la plataforma utilizada se encarga de comparar los espectros obtenidos con su propia librería de espectros. El sistema MALDI-MS Biotyper presenta una escala de semejanza o score del 0 al 3. El fabricante considera una identificación inaceptable por debajo de 1,7 de semejanza, aceptable a nivel de género de 1,7 a 2 y aceptable a nivel de especie por encima de 2. Algunos autores han evaluado este sistema modificando los criterios de aceptación de la identificación obtenida para mejorar el porcentaje de identificaciones. En la plataforma VITEK MS, los resultados fiables son los que obtienen una semejanza mayor o igual al 90%, aceptables entre el 85-90% y no fiables por debajo del 85%.

Las identificaciones obtenidas mediante espectrometría de masas tienen un grado de fiabilidad comparable a las técnicas de biología molecular, sin embargo conviene tener en cuenta varias precauciones:

1. Cuando la identificación obtenida no es la esperada, especialmente si se rebajan las exigencias del *score* para considerar válida la identificación. En este caso, se recomienda repetir la prueba varias veces e intentar conseguir la misma identificación con *scores* más altos. Esto es necesariamente recomendable cuando la identificación se ha realizado con un procedimiento abreviado de extracción o directamente sin extracción; en este caso se aconseja repetir la prueba con una extracción completa.
2. Cuando la identificación obtenida es una especie poco conocida. Se recomienda repetir la prueba y si el aislamiento tiene un alto valor clínico, confirmar esta identificación con otros métodos.
3. Cuando se va a identificar un hongo cuya identificación por MALDI-TOF MS ya se conoce como poco fiable porque está publicado en la literatura o por la experiencia propia. Siempre conviene verificar repitiendo el análisis para intentar obtener los *scores* más elevados y ante cualquier duda, confirmar mediante otros métodos.

Figura 1. Procedimiento de extracción del hemocultivo. Modificado de Yan Y et al; J Clin Microbiol. 2011; 49:2528–2532.



Hay que tener en cuenta que las librerías de ambos sistemas hoy por hoy tienen muchas limitaciones, especialmente en especies de hongos definidas o en número de espectros por cada especie (hay algunas especies que tienen solo un espectro), por eso se recomienda antes de realizar el análisis, que si se tiene un diagnóstico presuntivo, comprobar en la librería del MALDI-TOF MS, si ese hongo o esa familia de hongos que se va a estudiar está bien representada, porque eso garantizará la calidad del resultado.

8.1.6. Mantenimiento y consideraciones finales. El consumo de reactivos para la realización del test es mínimo y se limita a productos químicos comunes en cualquier laboratorio: ácido fórmico, acetonitrilo, agua químicamente pura, y especialmente la matriz, proporcionada por el fabricante. Hay que tener la precaución de conservar la matriz en condiciones óptimas en recipientes herméticamente cerrados ya que al ser un producto muy volátil, se evapora con facilidad lo que implica una pérdida o deterioro significativo del reactivo.

El mantenimiento del sistema es muy sencillo. Al menos semanalmente se requiere una calibración y cada cierto tiempo dependiendo del uso requerirá una limpieza del láser y una puesta a punto. Los detalles sobre el mantenimiento ya se especificaron en el procedimiento de la SEIMC nº 37 (2010) de "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología".

8.2. APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CAUSANTES DE IFIs

La identificación de aislados fúngicos por medio de biología molecular ha permitido avanzar en el conocimiento de diferentes especies fúngicas a las que no es posible diferenciar en base a sus características morfológicas o bioquímicas. En el laboratorio de microbiología, los hongos

levaduriformes se identifican fundamentalmente a través de pruebas bioquímicas mientras que los filamentosos se identifican por la morfología macroscópica y microscópica de sus estructuras. Lo que hasta ahora se han denominado especies, son en realidad complejos de especies indistinguibles por los métodos de identificación convencional.

La amplificación de genes conservados a lo largo de la evolución en una misma especie pero cuyas secuencias difieran lo suficiente entre diferentes especies es un requisito para poder discriminar a los microorganismos a este nivel. La región ITS1-5,8S-ITS2 cumplen estos requisitos y se consideran el «código de barras» de los hongos. Esta aproximación es importante para poder conocer de manera precisa la epidemiología de las especies causantes de IFIs.

La identificación molecular de las diferentes especies ha demostrado que, por ejemplo, *C. parapsilosis* es un complejo de especies formado por *C. parapsilosis*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*. Lo mismo ocurre con el complejo *C. glabrata* que está formado por *C. glabrata*, *Candida bracariensis* y *Candida novariensis*. En los hongos filamentosos, particularmente en el caso de *Aspergillus* spp., ocurre lo mismo y las especies morfológicamente identificadas como *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, o *A. niger* son complejos de diferentes especies. En el caso de *Aspergillus* spp., para poder llegar a una identificación definitiva a nivel de especie se debe amplificar y secuenciar el gen de la beta-tubulina.

En algunas ocasiones puede ser necesario llegar a realizar una caracterización molecular en cepas pertenecientes a la misma especie. Esto resulta esencial cuando se estudia la presencia de brotes nosocomiales de IFI. La caracterización molecular permite evaluar la distancia genética existente entre cepas de la misma especie. Hay diferentes sistemas para realizar la caracterización molecular de los

hongos, entre los cuales destacan el RAPD, RFLP, AFLP y los microsátélites. Estos últimos están cobrando gran interés en los últimos años por su reproducibilidad, su capacidad discriminadora, y la posibilidad de exportar los resultados a otros laboratorios. Los microsátélites son genes en tándem en los que se repite un número determinado de veces un motivo formado por 2 o más pares de bases. Los productos amplificados se someten a electroforesis capilar en un secuenciador y la motilidad de los mismos es proporcional al tamaño de los mismos. Existen varios microsátélites para obtener una caracterización genotípica en cepas de *Aspergillus* spp. y *Candida* spp.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17:750-755.
2. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sanchez F, García Rodríguez J et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2011; 29:39.e1-15.
3. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol* 2009; 47:877-884.
4. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16:1614-1619.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Third informational supplement. 2008. CLSI Document M27-S3. Wayne, PA. Clinical Laboratory Standards Institute.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. 2008. CLSI Document M38-A2. Wayne, PA. Clinical Laboratory Standards Institute.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, second edition. 2009. CLSI document M44-A2. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. CLSI Document M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk susceptibility testing of yeasts; Informational supplement. CLSI document M44-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M51-P. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M51-S1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
12. De Paw B, Walhs TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for research and treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORT/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*.2008;46:1813-1821.
13. De Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:4112-4120.
14. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:1614-1616.
15. Hope W, Billaud E, Lestner J, Denning DW. Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Current opinion in infectious diseases*, 2008; 21:580-586.
16. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. Beta-D-glucano assay for the diagnosis of invasive fungal infections:a meta-analysis.*Clin Infect Dis*. 2011; 52:750-770.
17. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*.2012;54:633-643.
18. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Úbeda A, Loza A, et al. on behalf of the CAVA II Study Group. Value of D glucan and CAGTA for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med*. 2012; 38:1315-1325.
19. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care*. 2010; 14:R222.
20. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:83-88.
21. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:654-659.
22. Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, et al. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:1285-1288.
23. Pemán J, Zaragoza R. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses*. 2010; 53:424-433.
24. Pemán J, Zaragoza R, Quindós G, Alkorta M, Cuétara MS, Camarena JJ, et al. Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 2011; 11:60.

25. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS ONE*. 2011; 6:e25712.

26. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14:398-440.

27. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14:982-984.

28. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and microflex analysis with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper System. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:2528–2532.

PNT-MIFI-1
Detección de anticuerpos frente a *Candida* spp.

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....
Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Candida spp.</i>	PNT-MIFI-1	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es definir la metodología para la realización del diagnóstico de la candidiasis invasora (CI) mediante la detección de anticuerpos antimanano y antimicelio en suero.

Este procedimiento es aplicable a muestras de suero de pacientes con sospecha clínica de CI y debe ser realizado en paralelo con el hemocultivo, ya que la combinación de diferentes pruebas diagnósticas aumenta el rendimiento de las mismas.

2. FUNDAMENTO

Se han desarrollado métodos alternativos al cultivo que pueden proporcionar al clínico información rápida y fiable ante la sospecha de una micosis invasora. Entre estos métodos destacan la detección de antígeno manano de *Candida spp.* y/o anticuerpos antimanano así como la detección de anticuerpos antimicelio para el estudio de la candidiasis invasora.

La detección, mediante ELISA, de antígeno manano y de anticuerpos frente a este antígeno de *Candida spp.* está disponible comercialmente desde hace años (Platelia Candida Ag® y Platelia Candida Ab/Ac/Ak®; Bio-Rad). Para evitar el escaso rendimiento de estas técnicas cuando se emplean por separado, se recomienda la realización conjunta de ambas pruebas en todo paciente con sospecha de CI. La detección conjunta de manano y de anticuerpos antimanano se ha demostrado útil en sujetos neutropénicos debido a su elevado valor predictivo negativo (95%).

Debido a la alta prevalencia de anticuerpos antimanano en la población sana o colonizada, se han investigado otros anticuerpos más específicos de CI. Entre ellos, destacan los dirigidos contra antígenos expresados en la fase micelial de *C. albicans* (antimicelio) y contra los antígenos citoplasmáticos. La detección de anticuerpos antimicelio presenta alta sensibilidad (84,4%) y especificidad (94,7%). Además, también permite el seguimiento evolutivo de la infección.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 1ª edición SEIMC 2000.

(<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología"; 2ª edición SEIMC 2003.

(<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: "Técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras". 2ª edición SEIMC 2005. En este procedimiento (PNT-TDA-07) se describe la técnica de detección de antígeno de *Candida spp.* (manano)

(<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 de "Diagnostico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos". PNT MIC-10;

2ª edición SEIMC 2006. En este procedimiento (PNT-MIC-10) se describe la técnica de detección de antígeno de *Candida spp.* (manano).

(<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)

- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Capítulo 14b. 2ª edición. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao 2006.

- Platelia Candida Ag Plus (Bio-Rad). Instrucciones del fabricante. 2009.

- Platelia Candida Ab Plus (Bio-Rad). Instrucciones del fabricante. 2009.

4. MUESTRAS

4.1 VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica que acompaña a cada muestra deben ser correctamente cumplimentados y en ellos deberán constar claramente:

- Datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), servicio de procedencia y datos del clínico que realiza la petición.

- Datos de la muestra (tipo, fecha y hora de obtención) y determinaciones microbiológicas solicitadas.

- Datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo).

4.2 RECOGIDA DE LA MUESTRA

Extraer asépticamente 5 mL sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se trata de procedimientos comerciales y los reactivos están incluidos en los kits disponibles Platelia *Candida* Ab Plus (Bio-Rad).

- Reactivos Platelia *Candida* Ab Plus: 1) Microplaca de 96 pocillos sensibilizados con manano purificado a partir de *C. albicans*; 2) Solución de lavado concentrada; 3) Calibrador 0 UA/ml; 4) Calibrador 5 UA/ml; 5) Calibrador 10 UA/ml; 6) Calibrador 20 UA/ml; 7) Calibrador 80 UA/ml; 8) Conjugado; 9) Diluyente de muestra 1; 10) Diluyente de muestra 2; 11) Solución TMB cromógeno; 12) Solución de parada; 13) Películas adhesivas. (UA: unidades arbitrarias).

6. APARATOS Y MATERIAL

Los equipos y materiales especificados en las instrucciones del fabricante de Platelia *Candida* Ag Plus y Platelia *Candida* Ab Plus (Bio-Rad).

- Ver Procedimientos en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21, PNT- MIC-10 y nº 19, PNT-TDA-07.

6.1. REACTIVOS Y MATERIAL PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMANANO
Además de los reactivos proporcionados con el kit comercializado, se necesitan los siguientes materiales:

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Candida spp.</i>	PNT-MIFI-1	
		Edición Nº 01	Página 3 de 5

- Pipetas de 20, 100 y 400 µl.
- Tubos para realizar diluciones.
- Agitador para tubos.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37°C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

6.2. REACTIVOS Y MATERIAL PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMICELIO

Además de los reactivos proporcionados con el kit comercializado, se necesitan los siguientes materiales:

- Papel absorbente
- Guantes de látex
- Micropipetas de 5, 20 y 250 µl
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos o placas de microtitulación para realizar diluciones seriadas
- Centrifuga para tubos Eppendorf que permita la centrifugación a 2.000 rpm
- Agitador orbital para tubos
- Estufa para incubar las muestras a 37°C
- Cámara húmeda
- Cubreobjetos
- Microscopio de fluorescencia

7. PROCEDIMIENTO

7.1 PLATELIA *Candida* Ab/Ac/Ak (Bio-Rad)

La prueba es una técnica de ELISA que detecta anticuerpos antimanano en suero.

7.1.2. Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en <24 h: refrigerar a 2-8°C.
2. Procesamiento después de 24 h tras recibir la muestra: congelar a -80°C.

No congelar y descongelar innecesariamente.

7.1.3. Procesamiento del suero

Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25°C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.

7.1.4. Procedimiento

Diluir el suero a estudiar realizando dos diluciones sucesivas 1:80 (10 µl del suero + 800 µl de diluyente). Se realiza la misma operación con los controles positivo y negativo y se preparan los calibradores para la realización de la curva patrón.

1. Se añaden 100 µl de cada uno de los sueros diluidos en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 100 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
2. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37°C durante 60 min.
3. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
4. Se añaden 100 µl del conjugado a cada uno de los pocillos.

5. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37°C durante 60 min.

6. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.

7. Se añaden 200 µl de la solución de revelado a cada uno de los pocillos y se incuba en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.

8. Se añaden 100 µl de la solución de parado a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir la solución de revelado.

9. Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

7.2 ANTICUERPOS ANTI-MICELIO (Vircell)

La prueba es una técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos frente a antígenos del micelio de *C. albicans* en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora.

La existencia de anticuerpos antimanano en la mayoría de las personas hace que casi todos los sueros contengan anticuerpos que reaccionan con la superficie de las fases levaduriforme y micelial de *C. albicans*. Para poder observar la existencia de anticuerpos frente a la fase micelial (anticuerpos antimicelio) el suero debe de absorberse con levaduras de *C. albicans* inviables por calentamiento.

7.2.1. Procedimiento

1. Diluir el suero 1/4 mezclando 10 µl del suero y 30 µl de PBS. Añadir 20 µl del suero diluido a un tubo con 80 µl de absorbente. Agitar bien e incubar 60 min a temperatura ambiente en un agitador orbital.
2. Centrifugar a 2.600 rpm durante 5 min y retirar el sobrenadante.
3. Realizar diluciones seriadas del suero adsorbido mezclando 30 µl del suero y 30 µl de PBS.
4. Dado que los portaobjetos de la prueba tienen 10 pocillos, se pueden estudiar ocho diluciones del suero en un portaobjetos. Añadir 20 µl de cada una de las diluciones del suero (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 y 1/2560) a ocho pocillos del portaobjetos. En los dos pocillos restantes añadir 20 µl de los sueros controles positivos y negativos proporcionados por el fabricante del kit.
5. Incubar durante 30 min a 37°C en cámara húmeda.
6. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
7. Añadir 20 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC a todos los pocillos e incubar durante 30 min a 37°C en cámara húmeda.
8. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
9. Montar el portaobjetos con el líquido de montaje y examinar con un microscopio de fluorescencia.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Candida</i> spp.	PNT-MIFI-1	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. ANTICUERPOS ANTIMANANO

Preparar la recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Calcular la concentración de anticuerpos anti-*Candida* de cada muestra por extrapolación de la densidad óptica en la curva patrón. En cada realización la prueba debe ser validada de acuerdo a las densidades ópticas y rangos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los resultados será la siguiente:

- Resultado positivo: concentración superior a 10 AU (arbitrary units)/ml.
- Resultado intermedio: concentración entre 5 y 10 AU/ml.
- Resultado negativo: concentración inferior a 5 AU/ml.

8.2. ANTICUERPOS ANTIMICELIO

Al observar la muestra al microscopio, la fluorescencia puede localizarse en la silueta e interior de los tubos germinales. Esta reactividad recibe la denominación 1. Cuando sólo se ve positiva la silueta del tubo germinal, la reactividad recibe la denominación 0,8. Si la silueta de los tubos germinales es positiva, pero algunos tubos germinales no se definen bien, la reactividad recibe la denominación 0,5. Si se aprecia que los tubos germinales son positivos, pero la reactividad es muy débil, se denomina 0,2. Finalmente, si ninguno de los tubos germinales presenta fluorescencia la reactividad se denomina 0. El título del suero será la última dilución del suero que registre valores de intensidad de fluorescencia $\geq 0,8$.

Las levaduras no deben de presentar fluorescencia y aparecerán de color rojo. En el caso de que las levaduras presenten fluorescencia, el suero probablemente tiene títulos muy elevados de anticuerpos antimanano y, por tanto, el suero adsorbido la primera vez debe de adsorberse de nuevo y repetirse la prueba. La presencia de anticuerpos antimicelio a un título igual o superior a 160 es compatible con una candidiasis invasora en un paciente inmunocompetente. Títulos menores pueden ser significativos en pacientes inmunocomprometidos. Si no se observan tubos germinales fluorescentes la prueba se considera negativa.

Informar los resultados indicando la titulación del suero. Títulos $\geq 1/160$ se consideran positivos.

9. RESPONSABILIDADES

- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de microbiología.
- El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción,

identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

- El personal técnico es responsable de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados.
- El personal facultativo es responsable de la valoración de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes. También es responsable de mantener al día los procedimientos y responder a las interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

10.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMANANO

- Los sueros con concentraciones superiores a 20 AU/ml deben diluirse 1:4 con el suero control negativo y volverse a estudiar. La concentración obtenida se multiplicará por cuatro.

- La presencia de anticuerpos anti-*Candida* es el resultado de una infección presente o pasada. Una variación importante en el título de anticuerpos anti-*Candida* puede constituir una evidencia de infección activa por *Candida* spp. y debe de confirmarse con los datos clínicos del paciente. Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasiva en pacientes inmunocomprometidos, ya que su capacidad para producir anticuerpos puede estar disminuida.

- Se ha demostrado la existencia de una complementación entre los títulos de anticuerpos antimanano y los títulos de manano, por lo que un suero de un paciente con riesgo de desarrollar una candidiasis invasiva que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos antimanano y viceversa.

10.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMICELIO

Si se van a estudiar varios sueros, se aconseja probar la dilución 1/20 de cada suero y titular posteriormente sólo los que sean positivos a esa dilución.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La presencia de anticuerpos antimanano por sí misma no es indicativa de infección activa por *Candida* spp.. El uso de varios biomarcadores en conjunto aumenta mucho el rendimiento diagnóstico de estas técnicas. En cualquier caso, se debe analizar la información obtenida en el contexto clínico del paciente. A pesar de las limitaciones de los hemocultivos, estos deben de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Candida</i> spp.	PNT-MIFI-1	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

seguir extrayéndose en pacientes en los que se soliciten biomarcadores para el diagnóstico de IFI.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care*. 2010;14:R222.

2. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:83-88.

3. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 2012;125 (Suppl 1):S14-24.

4. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:654-659.

5. Pemán J, Zaragoza R, Quindos G, Alkorta M, Cuétara MS, Camarena JJ, et al. Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 2011;11:60.

PNT-MIFI-2
Detección de ADN de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Aspergillus</i> spp. en muestras clínicas	PNT-MIFI-2	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este PNT es la descripción del procedimiento de detección cuantitativa de ADN de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas de diversa naturaleza, tras amplificación de las regiones conservadas de la subunidad del ARN ribosómico 18S.

Este procedimiento puede ser aplicado a muestras respiratorias y extra-respiratorias de pacientes con sospecha clínica de aspergilosis invasora. Supone además una disminución en el tiempo requerido para la detección e identificación de *Aspergillus* spp. en el cultivo de muestras clínicas.

2. FUNDAMENTO

La aspergilosis invasora es una enfermedad grave que afecta a pacientes con diferentes grados de inmunodepresión. El diagnóstico de la infección suele requerir la combinación de datos clínicos, microbiológicos, radiológicos, y deseablemente anatomopatológicos. El cultivo de muestras clínicas para el aislamiento de *Aspergillus* spp. es una de las herramientas más utilizadas para alcanzar el diagnóstico microbiológico de la aspergilosis invasora; sin embargo, el cultivo adolece de limitaciones importantes por su baja sensibilidad y especificidad. La detección de ADN de *Aspergillus* spp. pretende paliar estas deficiencias atribuidas al cultivo y anticipar la detección de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas. La detección del ADN de *Aspergillus* spp. se realiza mediante PCR cuantitativa en formato de tiempo real, haciendo uso de sondas FRET previa extracción y purificación del ADN del hongo presente en la muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de instrucciones del termociclador Light-Cycler (Roche ®).
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J Clin Microbiol 2000; 38:586-590.

4. MUESTRAS

Se puede detectar la presencia de *Aspergillus* spp. en diferentes muestras clínicas:

- a) Muestras del tracto respiratorio, biopsias y otras como las biopsias parafinadas.
- b) Plasma, suero o sangre completa: tubo con la muestra correspondiente.

1. Toma de muestras para su análisis y almacenamiento

a) Muestras del tracto respiratorio inferior: las muestras se reciben en el área de Recogida de Muestras y se procesan conforme a su circuito habitual. En el caso de que la muestra tenga petición para la detección de ADN de *Aspergillus* spp., o se trate de un lavado broncoalveolar (BAL), se separará una alícuota y se mantendrá refrigerada o congelada (4°C o -20°C). Se debe dejar la máxima cantidad de

muestra posible para la realización de la técnica de PCR. En el caso del BAL, la cantidad de muestra no debe ser nunca inferior a 1 ml. Es importante tener en cuenta que todas las muestras, salvo la sangre, suero o plasma, se deben sembrar adicionalmente en medios de cultivo específicos para hongos.

Las muestras parafinadas con petición de detección de DNA de *Aspergillus* spp. no se deben cultivar, pero pueden ser aceptadas para realizar esta determinación.

b) Las muestras de plasma, suero o sangre completa se deben centrifugar y se separará el sobrenadante. Este sobrenadante se debe congelar a -20°C hasta su posterior procesamiento.

2. Criterios de aceptación y rechazo

Se rechazarán:

- Muestras deficientemente identificadas.
- Muestras derramadas.
- Volúmenes insuficientes.

3. Acciones a tomar

- Muestra mal identificada o derramada: contactar con el servicio peticionario y se hará conocer dicha situación, solicitando el envío de nueva muestra o la correcta identificación de la misma por parte de dicho servicio.
- Volúmenes insuficientes: contactar con el servicio peticionario para el envío de nueva muestra.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

1. Reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos:

Kit: QIAamp DNA Mini y Midi Kit (Qiagen ®).

N-acetil-cisteína (Fluimucil ®): se usa para fluidificar muestras de consistencia muy mucosa.

2. Reactivos para amplificación y detección por medio de PCR a tiempo real:

Kit amplificación: FastStart Taq DNA Polymerase, (Roche Molecular Biochemicals ®).

Cebadores empleados:

5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG
5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG

Formato de sondas para PCR en tiempo real: se trata de dos oligonucleótidos diseñados como una sonda FRET y que hibridan en una secuencia interna específica de del gen 18S ARNr de *A. fumigatus*:

5'RED 640-TGA GGT TCC CCA GAA GGA
AAG GTC CAG C
5'FLUORESCENCIA-GTT CCC CCC ACA GCC
AGT GAA GGC

3. Otros reactivos contenidos en el kit de extracción QIAamp DNA Mini y Midi Kit (Qiagen ®): ATL, AL, AE, etanol, y soluciones de lavado AW1 y AW2.

- Otros reactivos necesarios para la extracción no incluidos en el kit de extracción QIAamp DNA Mini y Midi Kit (Qiagen ®): Proteinasa K, proteasa, y xilol.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Aspergillus</i> spp. en muestras clínicas	PNT-MIFI-2	
		Edición Nº 01	Página 3 de 6

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas
- Reloj cronómetro
- Gradillas
- Tubos de reacción
- Tapas
- Termobloque
- Termociclador (Light Cycler, Roche ®)
- Microcentrífuga
- Centrífuga
- Agitador tipo vórtex
- Tubos sarsted

7. PROCEDIMIENTO

Distribución de áreas:

Área 1. En primer lugar se realizarán las tareas en esta área para evitar posibles contaminaciones de reactivos.

- Preparación de los reactivos de QIAamp Blood Mini y Mini Kit.
- Preparación de oligonucleótidos y sondas.
- Preparación de Master Mix.
- Distribución de Master Mix en los capilares de la placa del Light Cycler.

Área 2.

- Preparación de las muestras clínicas para la detección de ADN de *Aspergillus* spp.
- Extracción de ácidos nucleicos de las muestras con los reactivos indicados.
- Carga de extractos de muestras en cada capilar para posterior amplificación y detección.

Área 3.

- Amplificación del ADN extraído en cada muestra en los capilares con la Master Mix preparada en área 1.

7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se han de atemperar en la campana de Área 2. Mientras se descongelan, se prepara la campana limpiando bien con clorogel todos los materiales que se vayan a utilizar durante la extracción como gradillas, pipetas, caja de puntas, etc., debido al carácter ambiental de *Aspergillus* spp. Una vez descongeladas, se rellenan las correspondientes fichas describiendo a su vez el tipo de muestra. Si la muestra es muy viscosa, se añadirá flumucil para fluidificarla. Esto es muy frecuente para el caso de los esputos y algunos broncoaspirados, pero nunca se debe utilizar en sangres o biopsias. El método de extracción depende del tipo de muestras:

1) Kit QIAamp Blood Mini: este método se utiliza para muestras respiratorias, tejidos y sueros con volúmenes inferiores a 300 µl. Existen dos procedimientos de extracción diferentes en función de la extracción de sobrenadantes (sueros, plasma, sangre, y otros fluidos biológicos) o centrifugados (muestras respiratorias y biopsias).

- a) *Muestras respiratorias y tejidos.* Partiendo de una centrifugación inicial de 10 minutos a 14.000

rpm, se separa el pellet del sobrenadante, que posteriormente se archivará para realizar otras determinaciones (como la de galactomanano). El volumen de trabajo final del pellet es muy variable y puede oscilar entre 15 µl y 300 µl aproximadamente. A este pellet se le añade 20 µl de proteinasa K más 180 µl de ATL y se incuba a 56° C entre 1 y 3 horas. Pasado este tiempo, se añade 200 µl de AL y se vuelve a incubar a 70°C durante 10 minutos. Tras cada incubación siempre se ha de dejar que se atemperen un poco, ya que al abrir el tapón parte de la muestra puede haberse evaporado y existe mayor riesgo de contaminación.

b) *Sangre, suero o plasma, y sobrenadantes de otros fluidos biológicos.* Partiendo de una centrifugación inicial de 10 minutos a 14.000 rpm, se separa el sobrenadante. El volumen de trabajo final es muy variable y puede oscilar entre 50 µl y 500 µl aproximadamente. A este sobrenadante se le añade 20 µl de proteasa más 200 µl de AL y se incuba a 56°C durante 3 horas.

Tras la incubación se ha de dejar que se atemperen un poco, ya que al abrir el tapón parte de la muestra puede haberse evaporado y existe mayor riesgo de contaminación.

A continuación, para ambos procedimientos, se añaden 200 µl de etanol, se agita brevemente en un vórtex para homogeneizar y se trasvasa el contenido a una columna con filtro. Estos tubos se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm. Seguidamente, se cambia la columna por una nueva y se procede a los lavados. Primero con 500 µl de solución de lavado AW1 a 8.000 rpm en 1 minuto, y segundo con 500 µl de solución de lavado AW2 a 14.000 rpm durante 3 minutos. Entre cada lavado se han de desechar siempre las columnas con residuos y cambiarlas por unas nuevas, hasta que finalmente se realiza una última centrifugación sin ninguna solución de lavado a 14.000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, se pasa la columna a un sarsted para eluir el ADN en 50 µl de AE a 8.000 rpm durante 1 minuto.

2) Kit Midi:

a) *Para volúmenes entre 0,3 y 1 ml.* La forma de procesar las muestras es exactamente igual que el anterior cambiando únicamente 2 pasos: el primero es que no se añade ATL sino que se parte directamente de la muestra con 20 µl de proteinasa K y 200 µl de AL; y el segundo es que se omite el paso de la incubación a 70°C de forma que tras la incubación a 56° C se añade el etanol.

Partiendo de esta cantidad de muestra, se añade 100 µl de proteasa y se agita con un vórtex para mezclar bien. A continuación se añaden 1,2 ml de AL, se invierte el tubo 10 veces y se agita fuertemente durante 1 minuto. Inmediatamente después se incuba a 70°C 10 minutos. Pasado este tiempo, se incluye en la mezcla 1 ml de etanol y se repite el proceso de homogeneización. Se trasvasa todo el contenido del tubo a una columna

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Aspergillus</i> spp. en muestras clínicas	PNT-MIFI-2	
		Edición Nº 01	Página 4 de 6

y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. Se desecha la columna y se procede a los lavados. Éstos consisten en añadir 2 ml de soluciones de lavado (AW1 y AW2 respectivamente) y realizar sendas centrifugaciones a 5.000 rpm durante 15 minutos. El último paso es eluir el ADN en 50 µl de AE con una centrifugación final de 2 minutos a 5.000 rpm, tras dejarlo 5 minutos a temperatura ambiente.

b) *Para volúmenes entre 1 y 2 ml.* Este proceso es muy parecido al anterior, existen muy pequeñas diferencias. Una de ellas es la cantidad de volúmenes que prácticamente se duplican:

- 200 µl de proteasa
- 2,4 ml de AL
- 2 ml de etanol
- 300 µl de AE

Las cantidades de soluciones de lavado son las mismas.

La otra diferencia es que, al tratarse de un volumen superior, no cabe todo en la columna y antes de comenzar con los lavados se debe transferir primero la mitad del producto que se obtiene tras añadir el etanol a una columna y centrifugar a 3.000 rpm 3 minutos. Repetir con la segunda mitad del volumen antes de comenzar con los lavados.

3) Muestras parafinadas. Antes de comenzar con el protocolo de extracción en muestras parafinadas, hay que pasar la muestra a un criotubo para añadirle 1.200 µl de xileno y agitarlo en un vórtex. A continuación se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante. Se añaden 1.200 µl de etanol (96-100 %), se agita nuevamente en vórtex y se realiza la misma centrifugación. Tras eliminar el sobrenadante se repiten los tres pasos anteriores una vez. Se incuba el tubo abierto a 37°C durante 10-15 minutos hasta que se evapore el etanol. Por último, se resuspende el pellet en 180 µl de ATL y se continua con el protocolo de extracción de tejidos.

Controles de extracción:

Durante el proceso de extracción de ADN de *Aspergillus* spp. se incluyen dos controles:

1. Control negativo de extracción: es una muestra respiratoria de la cual ya se conoce tanto el resultado del cultivo como de la PCR para *Aspergillus* spp. (negativos). Esta muestra inicial se divide en varias alícuotas para incluir cada una de ellas en cada grupo de muestras a extraer. Así, si el resultado de la PCR en esta muestra es positivo, se sabe que ha habido una contaminación cruzada durante el proceso de extracción y, por tanto, se deben invalidar todos los resultados de determinaciones positivas de las muestras que se hayan extraído al mismo tiempo.

2. Control de eficiencia: es un extracto de ADN de una cepa ATCC cultivada previamente y de la que se ha preparado una suspensión de hifas. Este extracto fue diluido de forma seriada, y cada dilución se cuantificó mediante PCR, de forma que se obtuvieron

alícuotas que se encontraban una dilución por encima del límite de detección de la PCR. La finalidad de este control es poder asegurar que la extracción ha sido eficiente y no ha habido ningún problema durante la misma.

7.2. PREPARACIÓN Y REALIZACIÓN DE LA PCR

1) Preparación de la master mix. La preparación de la master mix tiene lugar en la campana del área 1. Hay que limpiar previamente la campana con etanol al 70% antes de introducir los reactivos, así como las pipetas y todo el material que se utilice.

En un recipiente con hielo, se dejan descongelar los siguientes reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- Cloruro de magnesio
- Pareja de primers
- Sondas

Los oligonucleótidos se encuentran ya preparados y refrigerados en nevera. La cantidad de master mix que hay que preparar depende del número de muestras, multiplicando el número de éstas por las cantidades necesarias de cada reactivo que ya se determinó cuando se puso la PCR a punto (es recomendable hacer una planilla).

Todo este proceso se realizará en la campana y sin luz ya que ésta alteraría las sondas.

Una vez atemperados los reactivos, se mezclan todos los productos y se dispensan en cada capilar 18 µl de la master mix. También se añaden 2 µl del agua utilizada para preparar la master mix en uno de los capilares como control negativo de área 1.

2) Preparación de las muestras. En área 2 se prepara una dilución 1:10 de cada muestra y se cargan 2 µl en cada capilar de éstas (muestra y dilución). Además, se incluyen en otro capilar otros 2 µl del agua utilizada para realizar las diluciones como control negativo de área 2. La carga de muestras en los capilares se debe realizar sin luz.

Finalizado este paso, se da un pulso de centrifuga a los capilares a bajas revoluciones (ya que estos son muy frágiles y se rompen con facilidad) para que baje al fondo el contenido del capilar.

3) Amplificación del ADN de *Aspergillus* spp. (PCR a tiempo real). Finalmente, en área 3 se cargan los capilares en el carro del termociclador y se abre el programa específico para PCR *Aspergillus* spp. La duración es aproximadamente de 1 hora e incluye varios procesos:

- Activación
- Amplificación
- Melting
- Enfriamiento

En la siguiente tabla se muestran las condiciones de la PCR:

Modo de Análisis	Ciclos	Segmento	T	Tiempo	Modo de adquisición
Pre-Incubación					
Ninguno	1		95°	10'	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95°	1'	Ninguno
		Anillamiento	62,5°	15'	Único
		Elongación	72°	25'	Ninguno
Curvas de <i>melting</i>					
Curva de <i>melting</i>	1	Desnaturalización	95°	5'	Ninguno
		Anillamiento	65°	30'	Ninguno
		Paso de 40°	40°	0'	Ninguno
		<i>Melting</i>	95° (rampa = 0,1°/seg)	0'	Continuo
Enfriado					
Ninguno	1		40°	30'	Ninguno

7.3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la PCR se visualizan en la pantalla de amplificación y en la del *melting*. Se valida cada resultado de forma independiente.

Muestra negativa: se considera que en una muestra no se detecta ADN de *Aspergillus* spp. cuando no existe curva de amplificación o ésta no tiene forma exponencial. También puede ocurrir que aparezca una amplificación muy leve; en tal caso, aunque en la hoja de recogida de resultados se anotará como dudosa, en el informe emitido por el laboratorio se recogerá el resultado como negativo.

Muestra positiva: se considera que una muestra es positiva si existe la curva de amplificación exponencial. Para validar este resultado hay que visualizar la curva de *melting*:

- Si la curva de *melting* está en una temperatura de 70°C ±1°C, se considera que la muestra tiene ADN de *Aspergillus fumigatus*.

- Si la curva de *melting* está en una temperatura de 65°C ±1°C, se considera que la muestra tiene ADN de otras especies de *Aspergillus*.

Las curvas de *melting* sirven para validar el resultado, sin embargo, en el informe de microbiología no se alude a la especie identificada por dichas curvas.

7.4. ARCHIVO

Finalizada la realización de la técnica de PCR se archiva el extracto de ADN en la ADNteca, asignándole una posición en la gradilla que se

anotará en la ficha. Ésta permanece siempre congelada a -70°C.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El resultado de cada muestra se anota en su ficha correspondiente indicando siempre si es positiva o negativa. Además, los resultados también se registrarán en una base de datos.

Una vez a la semana se realizará una copia de seguridad del equipo.

Los resultados se expresarán en el informe microbiológico como "Positivo" (si existe amplificación de ADN de *Aspergillus* spp.), o como "Negativo" (si no se llega a detectar ADN de *Aspergillus* spp.).

9. RESPONSABILIDADES

- La responsabilidad de la realización de la técnica será de la persona que la realice (ya sea becario, técnico o facultativo).

- La emisión de resultados escritos definitivos es responsabilidad del facultativo responsable del área.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Hay que trabajar en campana de flujo laminar para evitar las potenciales contaminaciones.

- La PCR puede resultar inhibida. Se recomienda evaluar el porcentaje de inhibiciones añadiendo ADN genómico a muestras negativas a una concentración cercana al límite de sensibilidad de la técnica.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Aspergillus</i> spp. en muestras clínicas	PNT-MIFI-2	
		Edición Nº 01	Página 6 de 6

- Aunque la PCR descrita tiene un formato cuantitativo, los resultados se expresan de forma cualitativa debido a la ausencia de un punto de corte para interpretar las cuantificaciones. Sin embargo, se deben registrar los resultados de las cuantificaciones.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La presencia de ADN de *Aspergillus* spp. no prueba la presencia de enfermedad invasora, sobre todo cuando se aplica sobre muestras respiratorias, ya que la detección de *Aspergillus* spp. en muestras del tracto respiratorio inferior no discrimina entre infección o colonización.

- Por el contrario, la detección de ADN de *Aspergillus* spp. en muestras de biopsias o líquidos ordinariamente estériles debe ser considerada como significativa.

- La presencia de ADN de *Aspergillus* spp. suero de pacientes con aspergilosis es infrecuente.

- La petición de esta determinación debe ser realizada siempre en circunstancias clínicas bien justificadas y tras acordarlo con el facultativo del área.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, third edition, 2010. Qiagen (Hilden, Alemania).
2. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J Clin Microbiol 2000; 38:586-590.

PNT-MIFI-3
Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR	PNT-MIFI-3	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este PNT es la descripción del procedimiento de detección cualitativa universal de ADN fúngico presente en muestras clínicas de diversa naturaleza, tras amplificación de las regiones conservadas ITS.

Este procedimiento puede ser aplicado a muestras ordinariamente estériles de pacientes con sospecha clínica de micosis invasora. Supone además una disminución en el tiempo requerido para la detección e identificación de hongos oportunistas en cultivo de muestras clínicas. En algunos casos, es la única forma de conocer el agente etiológico causante de la micosis, especialmente cuando este no crece en los medios de cultivo.

2. FUNDAMENTO

Las infecciones fúngicas invasoras son enfermedades graves causadas por diferentes especies de hongos que afectan a pacientes con diferentes grados de inmunodepresión. El diagnóstico de la infección suele requerir la combinación de datos clínicos, microbiológicos, radiológicos, y deseablemente anatomopatológicos. El cultivo micológico de muestras clínicas es una de las herramientas más utilizadas para alcanzar el diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras; sin embargo, el cultivo presenta limitaciones importantes por su baja sensibilidad y especificidad. La detección de ADN fúngico universal pretende paliar estas deficiencias atribuidas al cultivo y anticipar la detección de hongos en muestras clínicas, lo que resulta de especial interés en aquellos casos en los que el cultivo resulta ser negativo. La detección panfúngica o universal del ADN se realiza mediante PCR cualitativa en formato estándar, tras el uso de *primers* universales y la posterior secuenciación de los productos amplificados previa extracción y purificación del ADN fúngico presente en la muestra. La región diana a amplificar es la región conservada ITS1-5.8S-ITS2.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de instrucciones del termociclador Gradient Thermocycler Biometra.- White, T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. *En* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA, 1990.
- R Bialek, F Konrad, J Kern, C Aepinus, L Cecenas, G M Gonzalez, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue *J Clin Pathology* 2005; 58:1180-1184.
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, third edition, 2010. Qiagen (Hilden, Alemania).
- Progama Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd).
- GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. MUESTRAS

Las muestras clínicas sobre las que se puede detectar la presencia de ADN panfúngico son variadas:

- Muestras de compartimentos ordinariamente estériles: biopsias (incluyendo las muestras de tejido parafinadas), líquidos ordinariamente estériles (plasma, suero, o sangre completa).
- Muestras respiratorias y superficiales (muestras cutáneas, oculares, etc.) solamente bajo petición clínica justificada y en circunstancias concretas.

1. Toma de muestras para su análisis y almacenamiento

a) Muestras respiratorias, biopsias y otras muestras diferentes a plasma, suero o sangre completa: las muestras se reciben en el área de Recogida de Muestras y se procesan conforme a su circuito habitual. En el caso de que la muestra tenga petición para la detección de ADN panfúngico, se separará una parte y se mantendrá congelada (-20°C) hasta su procesamiento. Se debe dejar la máxima cantidad de muestra posible para la determinación. Todas las muestras, salvo la sangre, suero o plasma, se sembrarán adicionalmente en medios de cultivo específicos para hongos siempre que sea posible.

b) Las muestras de plasma y suero se deben centrifugar y se separará el sobrenadante. Este sobrenadante se debe congelar a -20°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras de sangre completa se conservarán a 4°C.

c) Las muestras parafinadas con petición de detección de PCR panfúngica no se cultivarán, pero son aptas para poder realizar este procedimiento.

2. Criterios de aceptación y rechazo

Se rechazarán:

- Muestras deficientemente identificadas.
- Muestras derramadas.
- Volúmenes insuficientes.

3. Acciones a tomar

- Muestra mal identificada o derramada: contactar con el servicio peticionario y se hará conocer dicha situación, solicitando el envío de nueva muestra o la correcta identificación de la misma por parte de dicho servicio.

- Volúmenes insuficientes: contactar con el servicio peticionario para el envío de nueva muestra.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

1. Reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos:

- Kit: QIAamp DNA Mini y Midi Kit y DNA FFPE Tissue Kit (para muestras parafinadas) (Qiagen®).
- Fluimucil: se usa en caso de muestras respiratorias de consistencia muy mucosa (esputos, broncoaspirados, secreciones respiratorias, etc.).
- Otros reactivos contenidos en el kit de extracción QIAamp DNA Mini y Midi Kit (Qiagen®): ATL, AL, AE, etanol, y soluciones de lavado AW1 y AW2.
- Otros reactivos necesarios para la extracción no incluidos en el kit de extracción QIAamp DNA Mini y

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR	PNT-MIFI-3	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

Midi Kit (Qiagen ®): Proteinasa K, proteasa, liticosa, y xilol.

- Amplitaq Gold (Applied Biosystems).
- Geles de agarosa y Gel Red.
- Tampón TBE 1x.
- Kit de purificación de amplicones GFX PCR DNA y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Life Sciences).

2. Amplificación por PCR de las regiones conservadas:

Cebadores empleados: amplificación de región ribosómica intergénica conservada (ITS1-5.8S-ITS2) con los primers ITS-1 e ITS-4. El tamaño del fragmento depende del microorganismo aislado oscilando entre 350-800 pares de bases. La secuencia de los primers es la siguiente:

ITS-1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

Control interno: amplificación parcial del gen de la beta-globina humana para validar la presencia de ADN amplificable y excluir posibles inhibiciones de la PCR de acuerdo a la metodología descrita por Bialek y colaboradores (2005). El tamaño del fragmento corresponde con 268 pares de bases. La secuencia de los primers es la siguiente:

G1: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'
G2 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

3. Purificación de los amplicones amplificados con el kit de purificación.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas
- Reloj cronómetro
- Gradillas
- Tubos de reacción y tapas
- Tubos sarsted
- Termociclador (Gradient Thermocycler Biometra)
- Microcentrífuga (Mikro 200, Hettich)
- Equipo de imagen para la visualización de geles (BioRad)
- Termobloque (Biosan TS 100)
- Campana de bioseguridad (Telstar Bioy A/P)
- Cubeta electroforesis (VWR)
- Agitador tipo vórtex
- Horno microondas para preparación de geles de agarosa
- Nanodrop (Thermo Scientific)

7. PROCEDIMIENTO

Distribución de áreas: el procedimiento y procesamiento de las muestras se podrá llevar a cabo en los espacios del laboratorio destinados a técnicas moleculares. Todos estos espacios deben de estar organizados en tres áreas separadas donde se realizan los siguientes pasos del procedimiento:

Área 1. En primer lugar se realizarán las tareas en esta área para evitar posibles contaminaciones de reactivos.

- Preparación de los reactivos de QIAamp para la extracción del ADN.
- Preparación de oligonucleótidos.
- Preparación de Master Mix.
- Distribución de Master Mix en los pocillos de la placa multipocillo.

Área 2.

- Preparación de las muestras clínicas para la detección de ADN fúngico.
- Extracción de ADN de las muestras con los reactivos indicados.
- Carga de extractos de muestras en cada pocillo para posterior amplificación.

Área 3.

- Amplificación del ADN extraído (tanto fúngico como humano como control interno) en cada muestra.
- Electroforesis de agarosa para la verificación de la amplificación.
- Purificación de los amplicones.
- Cuantificación de ADN.

7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se han de atemperar en la campana de Área 2. Mientras se descongelan, se prepara la campana limpiando bien con clorogel todos los materiales que se vayan a utilizar durante la extracción como gradillas, pipetas, caja de puntas, etc.

Una vez descongeladas, se rellenan las correspondientes fichas describiendo a su vez el tipo de muestra. En caso de muestras respiratorias muy viscosas, se añadirá flumucil para fluidificarlas. Esto es muy frecuente en el caso de esputos y algunos broncoaspirados, pero nunca se debe utilizar en sangres o biopsias.

El método de extracción depende del tipo de muestras:

1) Kit QIAamp Blood Mini: éste método se utiliza para muestras respiratorias, tejidos, o sueros con volúmenes inferiores a 300µl. Existen dos procedimientos de extracción diferentes: extracción de sobrenadantes (sueros, plasma, sangre, y otros fluidos biológicos) o centrifugados (muestras respiratorias y biopsias).

a) Muestras respiratorias y tejidos.

- Pasar el volumen total de muestra a un sarsted y centrifugarlo a 14.000 rpm durante 10 minutos.
- Quitar el sobrenadante y guardarlo en otro tubo aparte para realizar otras determinaciones.
- Añadir al pellet 20 µl de proteinasa K y 180 µl de ATL.
- Agitar en vórtex enérgicamente e incubar a 56°C entre 1 y 3 horas.
- Dar un pulso de centrifuga para quitar la condensación y esperar a que se atempere.
- Añadir 50 µl de liticosa al 0,5 mg/ml y 200 µl de PBS e incubar durante 45 minutos a 37° C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR	PNT-MIFI-3	
		Edición Nº 01	Página 4 de 6

- Dar un pulso de centrifuga para quitar la condensación y esperar a que se atempere.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Añadir 200 µl de AL, agitar en vórtex suavemente y volver a incubar a 70°C durante 10 minutos.
- Dar un pulso de centrifuga para quitar la condensación y esperar a que se atempere.
- Añadir 200 µl de etanol, agitar en vórtex un poco para homogeneizar y trasvasar el contenido a una columna con filtro.
- Centrifugar 1 minuto 8.000 rpm y cambiar el tubo colector por uno nuevo.
- Añadir 500µl de AW1. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto y cambiar el tubo colector.
- Añadir 500µl de AW2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos y cambiar el tubo colector.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto para eliminar posibles restos de etanol.
- Cambiar el tubo colector por un sarsted. Añadir 50µl de AE y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tirar la columna y guardar el tubo con el ADN a 4°C.

En el caso de líquidos cefalorraquídeos y pleurales se analiza tanto el pellet como el sobrenadante.

2) QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (para muestras parafinadas):

- Pasar la muestra a un sarsted para añadirle 1.000 µl de xileno y agitar en vórtex fuertemente.
- Centrifugar a 14.000 rpm 2 minutos, eliminar el sobrenadante.
- Repetir este paso.
- Añadir 1.000 µl de etanol (96-100 %), agitar en vórtex y centrifugar a 14.000 rpm 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y repetir este paso.
- Incubar el tubo abierto a 37°C durante 10-15 minutos hasta que se evapore el etanol.
- Resuspender el pellet en 180 µl de ATL y 20 µl de proteinasa K, agitar en vórtex e incubar a 56°C durante 1 hora.
- Seguidamente incubar 1 hora a 90°C (si solamente hay un termobloque, hay que dejar la muestra a temperatura ambiente hasta que éste haya alcanzado los 90°C).
- Añadir 200 µl de buffer AL, agitar con un vórtex y trasvasar la mezcla a una columna.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
- A partir de este paso, el procedimiento es igual que el protocolo de muestras respiratorias y tejidos.

Una vez extraído el ADN, se prepara una dilución 1:10 del extracto para la PCR.

Controles de extracción:

Control negativo de extracción: es una muestra respiratoria de la cual ya se conoce tanto el resultado del cultivo para hongos como de la PCR para *Aspergillus* spp. (negativos). Esta muestra inicial se divide en varias alícuotas para incluir cada una de ellas en cada grupo de muestras a extraer. Así, si esta muestra sale posteriormente positiva en la PCR,

se sabe que ha habido una contaminación cruzada durante el proceso de extracción y, por tanto, se deben de invalidar todos los resultados de determinaciones positivas de las muestras que se hayan extraído al mismo tiempo.

7.2. PREPARACIÓN Y REALIZACIÓN DE LA PCR

En la campana de área 1 descongelar los reactivos pero siempre en refrigeración. Cuando estén completamente descongelados dar un pulso de centrifuga para mezclar bien. El protocolo de trabajo tanto para la región ITS como para el control interno es el siguiente:

	n = 1
Agua libre de nucleasas	26,1 µl
Cloruro de magnesio 25 mM	3 µl
Buffer 10x	5 µl
Primer F 5 µM	5 µl
Primer R 5 µM	5 µl
dNTPs 25 mM	0,4 µl
AmpliAq 5 U/ µl	0,5 µl
Total	45 µl

Cuando la *master mix* esté preparada dar un pulso para mezclar bien. Coger una gradilla de PCR y colocar tantos pocillos como reacciones se vayan a hacer, dispensar 45 µl en cada pocillo y tapar. Mientras se realiza este paso la placa debe estar colocada sobre una placa refrigerada para PCR.

En la campana de área 2 se dispensa el ADN correspondiente en cada pocillo. Se cargarán 5 µl del ADN extraído y de su dilución 1:10 correspondiente. Cuando esté cargada la placa se sellarán bien las tapas.

El control interno se amplificará también con 5 µl del ADN extraído y de su dilución 1:10 correspondiente. La amplificación se realizará en un pocillo independiente para así poder purificar directamente el amplicón correspondiente a la muestra en caso de positividad. Si la amplificación se realizara conjuntamente para la región ITS y el control interno, se necesitaría recortar el amplicón correspondiente a la muestra para su posterior secuenciación.

En área 3 se colocará la placa en el termociclador. Para instalar el programa se siguen los siguientes pasos:

1. Power
2. B: start/stop
3. Subdirectorio 1: (clave correspondiente)
4. D: enter
5. A: list
6. 2: ITS-TUB
7. D: enter
8. D: start

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR	PNT-MIFI-3	
		Edición Nº 01	Página 5 de 6

El programa de temperaturas es idéntico para la amplificación tanto de la región ITS como del control interno y se indica en la tabla siguiente.

	Temperatura	Tiempo
Activación	94°C	5 minutos
Amplificación (x 35)	94°C	30 segundos
	50°C	45 segundos
	72°C	2 minutos
Melting	72°C	5 minutos
Enfriamiento	4°C	∞

7.3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para preparar un gel de agarosa hay que mezclar en un matraz de 250 ml:

- 0,3 g agarosa
- 7,5 ml de Gel Red
- 22,5 ml de buffer TBE 1x

Fundir la agarosa mezclada con el buffer TBE en horno microondas. Colocar los peines que compondrán los pocillos en los que luego se dispensará el amplicón. Verter sobre un soporte de electroforesis y dejar enfriar hasta que se solidifique.

Una vez listo el gel, colocarlo dentro de la cubeta de electroforesis y llenar ésta con el mismo buffer que se ha empleado para preparar el gel hasta que lo cubra.

Cortar una banda ancha de parafilm en la que se mezclarán 5 µl de amplicón con 3 µl de azul de bromofenol. Cargar en el primer pocillo del gel el marcador de tamaño de 100 pb, seguido de los amplicones de la PCR en el orden establecido previamente.

Tapar la cubeta de electroforesis de modo que el electrodo con carga positiva quede en la dirección opuesta a los amplicones, y poner la fuente de alimentación a 70 voltios durante aproximadamente 30 minutos.

Revelar el gel en un aparato de imagen con luz ultravioleta para observar la existencia de bandas o no.

Muestra negativa: se considera que en una muestra no se detecta ADN fúngico cuando no existe banda en el revelado del gel y la amplificación del control interno es correcta.

Muestra inhibida: se considera que una muestra está inhibida cuando se observa ausencia de amplificación tanto en la muestra problema como en el control interno.

Muestra positiva: se considera que una muestra es positiva si existe una banda clara en el revelado del gel y la amplificación del control interno es correcta.

En este caso, y para poder determinar la especie del hongo detectado, se tiene que purificar el amplicón con el kit GFX PCR DNA y el Gel Band Purification Kit de GE Healthcare como se indica a continuación:

- Mezclar el buffer de captura con el contenido del pocillo de PCR (proporción de 500 µl de buffer de captura por cada 100 µl de amplicón).
- Traspasar la mezcla a una columna con filtro previamente identificada.
- Centrifugar a 16.000 g durante 30 segundos.
- Desechar el líquido del tubo colector.
- Añadir 500 µl de buffer de lavado.
- Centrifugar a 16.000 g durante 30 segundos.
- Desechar el líquido del tubo colector.
- Centrifugar 1 minuto a 16.000 g.
- Cambiar el tubo colector por un tubo limpio donde se recogerá el eluido.
- Añadir 15 µl de agua ultrapura.
- Dejar a temperatura ambiente 5 minutos
- Centrifugar 1 minuto a 16.000 g.

Una vez purificado, cuantificar el amplicón para determinar su concentración de ADN y pureza en el Nanodrop. El amplicón debe ser secuenciado en una unidad de secuenciación con una pareja de los primers utilizados para la amplificación.

Una vez obtenido el resultado, la secuencia se debe analizar con el programa Chromas y hacer alineamiento en Blast/Genebank para la identificación exacta del microorganismo (se considera la identificación como válida si la secuencia amplificada muestra una homología de ≥99% con respecto a las secuencias depositadas en GeneBank).

7.4. ARCHIVO

Finalizada la PCR se archiva el extracto de ADN en la ADNteca, asignándole una posición en la gradilla que se anotará en la ficha. Ésta permanece siempre congelada a -70° C.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El resultado en el informe microbiológico se informará como Positivo, Negativo, o Reacción Inhibida.

9. RESPONSABILIDADES

- La responsabilidad de la realización de la técnica será de la persona que la realice (ya sea becario, técnico o adjunto).
- La emisión de resultados escritos definitivos es responsabilidad del facultativo responsable del área.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La solicitud de realización de PCR panfúngica se debe restringir a muestras donde no se sospeche la presencia de saprófitos fúngicos cuya detección no aporte valor clínico.

La aplicación de este procedimiento a muestras de suero o plasma suele tener un valor limitado por la baja carga de hongo en estas muestras y por la presencia de inhibidores de la PCR.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección en muestras clínicas de ADN panfúngico por medio de PCR	PNT-MIFI-3	
		Edición Nº 01	Página 6 de 6

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La presencia de ADN de hongos no da el diagnóstico de enfermedad fúngica invasora y debe de ser evaluado en el contexto clínico correspondiente.
- La presencia de ADN fúngico en muestras respiratorias tiene poca significación clínica debido a la frecuente colonización por levaduras del tracto respiratorio inferior, por lo que esta muestra no es idónea para la determinación panfúngica de ADN.
- La PCR panfúngica no es capaz de identificar la presencia simultánea de dos o más especies fúngicas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathology* 2005; 58:1180-4.
- 2 White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. *In* M. A. Innis, D. H. Gefland, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, 1990.

PNT-MIFI-4

Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición Nº 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de levaduras y de hongos filamentosos, mediante técnicas de microdilución en caldo y técnicas de difusión en agar estandarizadas mediante el método de difusión con discos de antifúngicos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y de las técnicas de determinación de la sensibilidad *in vitro* de los mismos.

2. FUNDAMENTO

Existen varias técnicas de referencia para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Las técnicas del CLSI y del EUCAST son las más difundidas y de las que se disponen más estudios de validación. Mediante la realización de estas pruebas se determina la CMI de los antifúngicos por dilución en caldo RPMI con o sin glucosa, frente a levaduras y hongos filamentosos. El método de difusión con discos de antifúngicos es un procedimiento de difusión sencillo y práctico, validado para realizar estudios con fluconazol, posaconazol, voriconazol y caspofungina (documento M44-A2 y M 44-S2 del CLSI). Hasta la fecha sólo se ha validado para itraconazol, posaconazol, voriconazol en estudios con levaduras y para caspofungina y anfotericina B (documentos M51-A) para hongos filamentosos.

La realización de estas técnicas está indicada en aquellos casos en los que la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos ayude a optimizar el tratamiento antifúngico. Se recomienda determinar las sensibilidades antifúngicas en aislados provenientes de muestras de sangre y otros líquidos profundos, así como cepas de pacientes en los que se sospeche fallo terapéutico por la presencia de cepas resistentes.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 1ª edición SEIMC 2000. (<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad". PNT-MIC-11. 2ª edición SEIMC 2006. (<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>)
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. CLSI Document M27-A3. Wayne, PA. Clinical Laboratory Standards Institute 2008..
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Third informational

supplement. CLSI Document M27-S3. Wayne, PA. Clinical Laboratory Standards Standards Institute 2008.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. CLSI Document M38-A2. Wayne, PA. Clinical Laboratory Standards Standards Institute 2008.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk susceptibility testing of yeasts; Informational supplement. CLSI document M44-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, second edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M51-P. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M51-S1. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute 2009

- Clinical Laboratory Standards Institute.. Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI document M51-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA.2010

- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect 2008; 14:398-340.

- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect 2008; 14:982-984.

- Johnson EM, Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. *En*: Versalovic J. y cols. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. ASM Press. Washington DC. USA 2011.

- Manual de instrucciones y utilización de la técnica Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic System Ltd)

- Manual de instrucciones y utilización de la técnica Vitek2E-test (bioMerieux, España).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

- Manual de instrucciones y utilización de la técnica (bioMerieux, España).
- Manual de instrucciones y utilización de la técnica Neo-Sensitabs (A/S Rosco Laboratory, Taastrup, Denmark).

4. MUESTRAS

Las pruebas de sensibilidad por métodos de microdilución pueden realizarse a cepas de levaduras y hongos filamentosos cultivadas en medio sólido. Las pruebas sólo se pueden realizar sobre cepas de levaduras en cultivo puro.

El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados en el apartado anterior.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo utilizados, los antifúngicos y el resto de reactivos están descritos en Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente.

6. APARATOS Y MATERIAL

Los aparatos y materiales necesarios están descritos en Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. MÉTODOS DE REFERENCIA DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

En este apartado se hará una breve descripción de las técnicas de referencia. No obstante, las instituciones que realicen estas pruebas deben disponer de los documentos en los que se describen las técnicas de referencia, enumerados en el apartado 3 de este PNT y pueden obtenerse en www.clsi.org y en www.eucast.org.

7.1.1. Realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos con levaduras. En el documento científico de este procedimiento están descritas las especificaciones del método de microdilución para levaduras por los dos métodos estandarizados (CLSI y EUCAST).

7.1.1.1. Preparación de los antifúngicos

Se preparan tal como está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente. En la tabla 1 se muestran los disolventes y las concentraciones a la que se recomiendan preparar los diferentes antifúngicos.

7.1.1.2. Preparación de las placas de microdilución.

Las placas deben ser de microdilución, estériles, con 96 pocillos de fondo plano en caso de utilizar el método EUCAST, y de fondo en "U" en caso de usar el del CLSI.

El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente.

7.1.1.3. Preparación del inóculo. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente.

7.1.1.4. Inoculación e incubación de las placas. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente.

7.1.1.5. Control de calidad. El control de calidad se realiza siguiendo de forma similar al descrito en los documentos de referencia. Se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución.

Se recomienda mantener las cepas control de calidad a -70°C. Si se quieren mantener almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservar a 2°-8°C, durante 15 días. Tras esas dos semanas deben subcultivarse de nuevo.

Las cepas control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMIs están dentro del intervalo de control.

Si tras repetir el test 20 veces en días distintos, la CMI de la cepa control no se incluye en el intervalo en más de una ocasión, debe analizarse todo el proceso en busca del error.

En la tabla 2 se incluyen los valores de referencia para las cepas de control de calidad utilizadas, según estos documentos.

7.1.2. Realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos con hongos filamentosos

7.1.2.1. Preparación de los antifúngicos. Todo el proceso de preparación de los antifúngicos es similar al descrito en el apartado de pruebas de sensibilidad con levaduras.

7.1.2.2. Preparación de las placas de microdilución. Es similar al descrito para las levaduras.

7.1.2.3. Preparación del inóculo. Tanto la preparación como el tamaño del inóculo están descritos en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados arriba, así como en la tabla 3 de este PNT.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

Tabla 1. Resumen para la preparación de los antifúngicos en estudios de sensibilidad para cada antifúngico

Antifúngico	Disolvente	Concentración de la solución madre en mg/L	Intervalos de concentración recomendados en mg/L
Anfotericina B	DMSO	3.200	0,03-16
Fluorocitosina	Agua	12.800	0,125-64
Fluconazol	Agua	12.800	0,125-64
Itraconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Voriconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Ketoconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Posaconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Caspofungina	Agua	3.200	0,03-16
Micafungina	Agua	3.200	0,03-16
Anidulafungina	DMSO	3.200	0,03-16

Tabla 2. Intervalos de CMI (mg/L) de las cepas control para los métodos de referencia tras 24 horas de incubación.

Antifúngico	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	
	CMI obtenidas por EUCAST	CMI obtenidas por CLSI	CMI obtenidas por EUCAST	CMI obtenidas por CLSI
Anfotericina B	0,12-1	0,25-2,0	0,12-1	0,5-2,0
Fluorocitosina	0,12-0,5	0,06-0,25	1-4	4-16
Fluconazol	0,5-2	0,5-4	16-64	8-64
Itraconazol	0,03-0,12	0,12-0,5	0,03-0,12	0,12-1
Voriconazol	0,015-0,06	0,016-0,12	0,03-0,12	0,12-1
Ketoconazol	-	0,03-0,25	-	0,12-1
Posaconazol	0,015-0,06	0,06-0,5	0,015-0,06	0,06-0,5
Caspofungina	-	0,25-1	-	0,12-1
Micafungina	-	0,5-2	-	0,12-0,5
Anidulafungina	0,25-1	0,25-2	<=0,06	0,03-0,12
Ravuconazol	-	0,016-0,12	-	0,06-0,5

Tabla 3. Densidad óptica y tamaños de inóculo según el documento M38-A2 del CLSI

Especies	Densidad óptica a 530 nm
<i>Aspergillus</i> spp.	0,09-0,13
<i>Alternaria</i> spp.	0,25-0,3
<i>Fusarium</i> spp.	0,15-0,17
<i>Bipolaris</i> spp.	0,25-0,3
<i>Exophiala dermatitidis</i>	0,09-0,13
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0,15-0,17
Mucorales	0,15-0,17
<i>Paecilomyces</i> spp.	0,09-0,13
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,11-0,17

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

7.1.2.4. Inoculación e incubación de las placas. La inoculación es similar a la descrita en levaduras.

El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente, así como en la tabla 3 de este PNT.

7.1.2.5. Control de calidad. El control de calidad es similar al descrito para las levaduras, aunque pueden utilizarse otras cepas control, que vienen recogidas en los documentos de los estándares del CLSI y del EUCAST.

7.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO PARA LEVADURAS

Para realizar esta técnica deben seguirse las recomendaciones recogidas en el documento M44-A2 y M44-S2. La tabla 4 resume este procedimiento.

7.2.1. Preparación del medio de cultivo. La preparación del medio del cultivo está descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-11, y en los documentos de consulta enumerados y en la tabla 4.

7.2.2. Preparación del inóculo e incubación. La preparación del medio del cultivo está descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-11, y en los documentos de consulta enumerados y en la tabla 4.

7.2.3. Lectura de las placas. La lectura esta descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-11, y en los documentos de consulta enumerados arriba y en la tablas 5 y 6.

7.3. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO PARA HONGOS FILAMENTOSOS

Para realizar esta técnica deben seguirse las recomendaciones recogidas en el documento M51-A y M51-S2. La tabla 7 resume este procedimiento.

7.3.1. Preparación del medio de cultivo. La preparación del medio del cultivo esta descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-13, y en los documentos de consulta enumerados y en la tabla 7.

7.3.2. Preparación del inóculo e incubación. La preparación del medio del cultivo esta descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-13, y en los documentos de consulta enumerados y en la tabla 7.

7.3.3. Lectura de las placas. Puede realizarse visualmente con regla o calibre, tal como se describe en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad", 2006, en el PNT-MIC-13, y en los documentos de consulta enumerados y en la tabla 7.

7.3.4. Control de calidad. El control de calidad se realiza de forma similar al descrito en el apartado de levaduras.

7.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS COMERCIALES

7.4.1. Sensititre YeastOne (Microdilución) (TREK Diagnostic System Ltd)

7.4.2. Vitek2 (Microdilución) (BioMerieux, España)

7.4.3. Etest (Difusión) (BioMerieux, España)

7.4.4. Neo-sensitabs (Difusión) (A/S Rosco Laboratory, Taastrup, Denmark)

Para la utilización de cualquiera de estos métodos hay que seguir las instrucciones del fabricante.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La lectura de las placas para las levaduras y los hongos filamentosos está descrita en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 21 (2006) de "Diagnóstico microbiológico de micosis y estudio de sensibilidad" en el PNT-MIC-11 y en los documentos de consulta enumerados anteriormente. Para la interpretación y expresión de los resultados ver el documento científico de este procedimiento y las tablas 1 y 2 de dicho documento.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla un facultativo especialista responsable del laboratorio de microbiología.

Las responsabilidades deben estar perfectamente descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

Tabla 4. Resumen documento M44-A2 y M44-S2 (CLSI)

Medio de cultivo	Agar Mueller Hinton + 2% glucosa + 0,5 mg/ml azul de metileno
pH	7,2 – 7,4
Inóculo	0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml)
Tiempo y temperatura de incubación	35 °C durante 20 - 24 h Algunos aislados de <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. krusei</i> a menudo necesitan 48h.
Carga del disco	Fluconazol: 25 µg Voriconazol: 1 µg Posaconazol: 5 µg Caspofungina: 5 µg
Medida del halo de inhibición	Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento

Tabla 5. Halos de inhibición (mm) de las cepas de control calidad para la técnica de difusión con discos.

Antifúngico	Discos (µg)	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Fluconazol	25	28-39	22-33	26-37	No aplicable
Voriconazol	1	31-42	28-37	No aplicable	16-25
Posaconazol	5	24-34	25-36	23-33	23-31
Caspofungina	4	18-27	14-23	20-27	19-26

Tabla 6. Puntos de corte propuestos por el CLSI M44-A2 para levaduras

Antifúngico	Sensible	Sensible dosis dependiente	Resistente
Fluconazol	≥ 19 mm	15-18 mm	≤ 14 mm
Voriconazol	≥ 17 mm	14-16 mm	≤ 13 mm
Caspofungina	≥ 11 mm		≤ 13 mm* (no sensible)

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

Tabla 7. Resumen documentos M51-A (CLSI)

Medio de cultivo	Agar Mueller Hinton
pH	7,2 – 7,4
Inóculo	$0,4 \times 10^6$ - 5×10^6 UFC/ml
Tiempo y temperatura incubación	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , y <i>A. niger</i> : 24 h a 35 °C Otros <i>Aspergillus</i> spp:24- 48h Mucorales: 16-24 h a 35 °C <i>Alternaria</i> spp., <i>Bipolaris</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Pseudallescheria boydii</i> complex y <i>S. Prolificans</i> : 48 a 72h a 35 °C
Carga del disco	Itrconazol: 10 µg (no recomendado en Mucorales) Voriconazol: 1 µg Posaconazol: 5 µg Caspofungina: 5 µg Anfotericina B: 10 µg (recomendado solo para Mucorales)
Medida del halo de inhibición	Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento (80%). Para caspofungina ignorar las microcolonias dentro del halo de inhibición Para triazoles, ignorar las hifas que pasan el borde del halo de inhibición y el ligero crecimiento (trailing) alrededor del halo de inhibición.
Cepas control	<i>Paecilomyces variotii</i> MYA 3630, <i>Candida krusei</i> ATCC 6258

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todos los procedimientos deben seguir las normas de bioseguridad e higiene en microbiología, que deben estar recogidas en un protocolo normalizado del laboratorio.

Se recomienda que estas técnicas sean realizadas por laboratorios que tengan un número de cepas elevado. Montar estas técnicas a demanda, de modo esporádico, impide que pueda hacerse un control efectivo de lotes, por lo que pueden producirse errores.

Cuando se hace lectura visual en pruebas con levaduras, el error más habitual es interpretar el crecimiento residual (*trailing*), que se observa con fármacos fungistáticos como los azoles, como auténtica resistencia. Esto sólo puede evitarse con experiencia y formación previa.

Si se tiene un número bajo de cepas es mejor utilizar técnicas de difusión o métodos comerciales, para conocer la sensibilidad a los azoles, y remitir la cepa a un centro de referencia.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones están descritas en el documento científico de este procedimiento y las más importantes se enumeran a continuación.

Limitaciones de los procedimientos de microdilución para levaduras:

- El método ha sido descrito únicamente para determinar la sensibilidad de *Candida* spp. y *C. neoformans*. Puede aplicarse a otras levaduras con la excepción de *Malassezia furfur* debido a sus especiales requerimientos nutricionales.
- Los puntos de corte son aplicables a los antifúngicos sistémicos. Por lo tanto no se han de aplicar a los antifúngicos administrados por otras vías (por ejemplo, vía tópica, inhalatoria).
- La lectura de los resultados es difícil y requiere personal entrenado.
- No identifica los aislados resistentes a anfotericina B.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo y métodos alternativos	PNT-MIFI-4	
		Edición Nº 01	Página 8 de 8

e) Carece de puntos de corte clínicos para anfotericina B y posaconazol.

Limitaciones de los procedimientos de microdilución para hongos filamentosos:

Los puntos de corte son epidemiológicos y no clínicos; por lo tanto, los hongos filamentosos solo se pueden clasificar como sensibles o con sensibilidad reducida al antifúngico.

Limitaciones de los procedimientos de difusión en disco:

Estas técnicas no son muy útiles para realizar pruebas con especies de levaduras de crecimiento lento.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7:107-119.

2. Cejudo MA, Gallego AG, Lacasa EC, Aller AI, Romero A, Garcia JP, Andres GQ, Martin-Mazuelos E. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference methods. *Med Mycol*. 2010; 48:710-719.

3. Espinel-Ingroff, A; E. Canton, D. Gibbs, and A. Wang. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol*. 2007;45:858-864.

4. Pfaller MA and Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2846.

PNT-MIFI-5
Identificación de hongos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de hongos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)	PNT-MIFI-5	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procedimiento de identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) con la plataforma MALDI-Biotyper (Brüker-Daltonics). de aislados de hongos levaduriformes o filamentosos. Este procedimiento es aplicable a aquellos aislados puros provenientes de cultivos en medio sólido o en frascos de hemocultivos, provenientes de muestras clínicas en las que dicho aislamiento se ha considerado significativo y se pretende conocer la especie de hongo aislado.

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) permite la identificación de hongos mediante la creación de un espectro que traduce el perfil proteico (fundamentalmente riboproteico) del hongo estudiado. Se consigue añadiendo una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) a una porción de la colonia directamente, o a un extracto tras un procedimiento de extracción proteica del aislado. Esta matriz es extremadamente volátil y al evaporarse cocristaliza con la muestra. La mezcla es bombardeada con un rayo láser y los fragmentos ionizados del microorganismo son enviados a una columna de ultravacío con un detector en su extremo. Estos fragmentos son péptidos, fundamentalmente riboproteicos, que tardan más o menos en llegar al detector en función de su tamaño y carga. Esto se traduce en un espectro de picos en masa/carga (m/z) que se compara con una librería de espectros. La comparación se expresa mediante una escala de semejanza o *score* que proporciona la calidad de la identificación obtenida.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad del laboratorio
- Manual MALDI Biotyper 3.0
- Bou G (Coordinador), Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
- Procedimientos en Microbiología Clínica nº 37, 2ª edición. SEIMC 2010.
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

4.1 COLONIAS DE MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Se debe partir de un cultivo puro de una levadura o un hongo filamentosos. En el caso de levaduras u hongos filamentosos de rápido crecimiento es preferible que los cultivos sean frescos y no superiores a 72 h. En el caso de los filamentosos, además, se recomienda que la colonia esté madura con esporulación completa.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DEL HEMOCULTIVO CRECIDO

Se puede identificar la levadura que haya crecido en un hemocultivo directamente sin esperar al crecimiento en medio sólido. Se recomienda hacer una tinción previa del hemocultivo para comprobar que se encuentra en cultivo puro. Posteriormente, una alícuota del hemocultivo se someterá a un procedimiento de lavado, concentración y extracción antes de realizar la espectrometría de masas.

Hay que tener en cuenta que aquellos sistemas de hemocultivos con partículas de carbón, tienen un rendimiento significativamente menor con MALDI-TOF MS por lo que no se recomienda la identificación directa.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (liofilizado, -20°C)
- Control BST
- Acetonitrilo
- Ácido tri-fluoro-acético
- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- Ácido fórmico al 70%
- Ácido tri-fluoro-acético al 80%
- Agua destilada estéril (agua grado HPLC)
- Reactivos Sepsityper para la identificación directa proporcionados por el fabricante (Brüker)

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1 EQUIPO

Equipo MALDI-Biotyper que incluye:

- Espectrómetro con la columna de MALDI-TOF.
- Programa de ordenador adecuado para la realización de la espectrometría y para la identificación.

6.2. MATERIAL

- Tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad.
- Micropipetas calibradas de 1 μ l, 200 μ l y 1000 μ l.
- Puntas de pipeta de 1 μ l, 200 μ l y 1000 μ l
- Asas de siembra estériles desechables
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Gradillas para tubos de PCR
- Colectores plásticos para material desechable

7. PROCEDIMIENTO

7.1. COLONIAS DE MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO.

7.1.1. Procedimiento de extracción con etanol-fórmico

1. Resuspender en 300 μ l de agua con calidad HPLC en un tubo Eppendorf, la colonia o parte de la colonia de levadura o raspado de la superficie de un hongo filamentosos bien esporulado. Agitar con vórtex.
2. Añadir 900 μ l de etanol absoluto. Agitar con vórtex.
3. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de hongos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)	PNT-MIFI-5	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

4. Volver a centrifugar 2 minutos. Aspirar con una punta de pipeta el sobrenadante con cuidado de no llevarse el sedimento. Dejar evaporar el etanol dejando el tubo abierto durante 5 o 10 minutos.
5. Añadir ácido fórmico al 70% en un volumen igual al sedimento que ha quedado. Resuspender.
6. Añadir acetonitrilo en la misma cantidad que ha quedado de sedimento. Resuspender.
7. Centrifugar de nuevo 2 minutos a 13.000 rpm.
8. El sobrenadante ya está listo para ser analizado.

El sistema de extracción se puede abreviar con resultados aceptables aunque se obtienen *scores* más bajos. Para ello se deposita directamente la colonia del hongo en el pocillo de la placa, se deja secar a temperatura ambiente y se añade 1µl de ácido fórmico, se deja secar y se añade después la matriz.

7.2. LEVADURAS CRECIDAS EN HEMOCULTIVO

7.2.1. Procesamiento previo de hemocultivos.

Existen distintos protocolos para el procesamiento previo de hemocultivos con levaduras crecidas. La casa comercial (Brüker-Daltonics) recomienda una que consiste en la centrifugación de 1 ml de hemocultivo con 200 µl de *buffer* de lisis a 13.000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y volver a centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Resuspender el sedimento con 1 ml de *washing buffer* y volver a centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante y realizar una extracción del sedimento.

El *buffer* de lisis y el *washing buffer* son reactivos comercializados por Brüker.

Sobre este protocolo se han realizado distintas modificaciones para simplificarlo. Uno de ellos utiliza 4 ml de hemocultivo en un tubo, se le añade 800 µl de *buffer* de lisis, se centrifuga 1 minuto a 13.000 rpm, se decanta. Después se resuspende el sedimento con 1 ml de agua estéril homogeneizando. Se vuelve a centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Se elimina el sobrenadante cuidadosamente y se transfiere el sedimento a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se vuelve a centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm y se elimina el sobrenadante para trabajar con el sedimento.

7.2.2. Espectrometría de masas

1. Recoger 1 µl de sobrenadante y depositarlo en uno de los círculos de la placa metálica. Dejar secar.
2. Añadir 1 µl de matriz HCCA. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Introducir los datos de la muestra y crear un nuevo proyecto en el *software* siguiendo las instrucciones del fabricante.
4. Introducir la placa en el MALDI-TOF MS. Iniciar el análisis.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El sistema proporciona las identificaciones de las muestras en poco tiempo junto con un *score* de certeza en la identificación. En principio un *score*

menor de 1,7 ofrece una identificación no fiable. Entre 1,7-2 sería una identificación aceptable a nivel de género y mayor de 2 sería una buena identificación a nivel de especie. Según la experiencia del facultativo, algunas identificaciones se pueden aceptar con *scores* bajos, sin embargo se recomienda confirmar siempre que el resultado no sea el esperado, especialmente con *scores* < 2.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento debe realizarse por personal técnico especialmente entrenado.

La validación y aceptación de las identificaciones obtenidas deben ser realizadas por el facultativo responsable del área.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Conviene siempre en cada ensayo colocar un control proteico conocido de *E. coli* (BST).
- Conviene realizar una calibración del sistema al menos una vez por semana con un control BST y una matriz recién reconstituidos siguiendo las instrucciones del fabricante recogidas en el manual.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Hay que tener en cuenta las limitaciones derivadas de su librería interna que contiene un número limitado de microorganismos.
- El sistema puede fallar con cultivos viejos o demasiado jóvenes.
- Existen algunos problemas con algunas especies muy similares que hay que considerar. Por ejemplo, *Candida albicans* y *Candida africana* o *Trichophyton tonsurans* y *Trichophyton interdigitale*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferroni A, Suarez S, Beretti J-L, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:1542-8.
2. Quiles-Melero I, García Rodríguez J, Gomez-Lopez A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 31: 67-71.
3. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large Microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2011; 50:176-9.
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) for the identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 3482-6.
5. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, et al. Improved Identification of Yeast Species Directly from Positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper System *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 2528-32.