

DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME *Candida spp.*

MET-CNSP-100


Elaborado por: CNSP Blga Flor Urcia Ausejo
CNSP Tec Lab Alida Navarro Mariñas

Revisado por : CNSP Med. Susana Zurita Macalupu
CNSP Blga. Gabriela Salinas Coronel
CNSP Blga. Gloria Arotinco Garayar

Aprobado por: CNSP Med. Luis Alberto Vergara Fernández


RD N° 196 -2016-DG-CNSP/INS

Fecha: 01 / 08 / 2016

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

ÍNDICE

	Pág.
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
2. REFERENCIAS	3
3. DEFINICIONES OPERATIVAS	4
4. FUNDAMENTO DEL MÉTODO	4
5. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO	4
6. INFORME DE RESULTADOS	7
7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	7
8. FORMULARIO	7
9. ANEXOS	8


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición Nº 01

1 ÁMBITO DE APLICACIÓN:

El método de ensayo se aplica a muestras de cepas para determinación de susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriforme *Candida spp.* y son procesados en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Salud Pública del INS.

2 REFERENCIAS:

- 2.1 Documento externo: EXT-CNSP-133: CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Volume 29 Number 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009 (Pág 1-42).
- 2.2 Documento externo: EXT-CNSP-133: CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Volume 29 Number 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009 (Pág 1-42).
- 2.3 Cantón E. Métodos microbiológicos para el diagnóstico manejo y estudio de la infección fúngica invasora. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2014; 32(6)
- 2.4 PRT-CNSP-002: Mantenimiento y Calibración de Equipos de Laboratorio.
- 2.5 PRT-CNSP-006: Manejo, Conservación y Almacenamiento de Muestras de Laboratorio y Áreas.
- 2.6 PRT-CNSP-005: Gestión y Manejo de Residuos.
- 2.7 PRA-CNSP-014: Manipulación y Conservación de Materiales e Insumos.
- 2.8 Serie de Normas Técnicas N° 18 - Manual-INS-001 Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos - 3ª Edición, año 2005 – Instituto Nacional de Salud.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

3 DEFINICIONES OPERATIVAS

- 3.1 **Susceptibilidad antifúngica:** Proceso conocido habitualmente como antifungi-grama, guía la elección del tratamiento antimicótico. Se utilizan diferentes métodos como difusión con discos y la microdilución. La información que se genera (sensible, intermedio o resistente) predice la eficacia clínica en la elección de un antimicótico.
- 3.2 **Halo de inhibición:** Este es un resultado cualitativo, cuyo diámetro será directamente proporcional a la potencia del antifúngico frente al hongo en cuestión e inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antifúngico.
- 3.3 **Cepa ATCC:** Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, al cual se le ha realizado pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.


4 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton II modificado (MHm) previamente inoculada con la cepa ***Candida spp.*** Discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antifúngicos fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg). Tan pronto el disco impregnado en antifúngico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antifúngico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 24 a 48 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento de ***Candida spp.***

5 DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO

5.1 Equipos, materiales y Reactivos requeridos

- 5.1.1 Material plástico / vidrio
- Placas Petri de 90 mm
 - Tubos de vidrio con tapa rosca.
 - Pinzas planas estériles
 - Reglas de 30 cms
 - Hisopos estériles
 - Gradillas para tubos 13X100 mm
 - Mecheros de alcohol
 - Guantes
 - Mascarillas
 - Gorros descartables
- 5.1.2 Reactivos
- Mueller-Hinton (Anexo 1)
 - Azul de Metileno (0.1 g)
 - Glucosa (20 g.)

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

- Agar Sabouraud Glucosa
- Fluconazol (Cartucho por 50)
- Voriconazol (Cartucho por 50)

5.1.3 Tipos de muestra

5.1.3.1 Muestras primarias

- Cepas ***Candida spp.***

5.1.3.2 Material de Referencia

- ***Candida krusei*** ATCC 6258
- ***Candida parapsilosis*** ATCC 22019
- ***Candida albicans*** ATCC 90028
- ***Candida tropicales*** ATCC 750

5.1.3.3 Equipos


- Vórtex
- Incubadora
- Autoclave

5.1.3.4 Otros

- Escala Mc Farland 0.5
- Asa de siembra
- Solución salina estéril

5.2 Preparación del inóculo y siembra

- a. Se parte de un cultivo puro con 24 horas de incubación a 37 ° C.
- b. Se toma con la punta del asa de siembra la cepa y se la resuspende en un tubo con 5 mL de SSE.
- c. Homogeneizar con vórtex y ajustar la turbidez a 0.5 en la escala Mc Farland (equivale a 1×10^6 – 5×10^6 UFC/mL). Este inóculo suspendido usarlo inmediatamente.
- d. Colocar el hisopo dentro del tubo que contiene la suspensión del inóculo. Embeber y rotar contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- e. Sembrar cuidadosamente (sin presionar el hisopo) la placa de Mueller-Hinton II modificado (MHm) en 3 direcciones, para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma.
- f. Colocar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, para que se absorba la humedad. Evitar tiempos más prolongados de secado.
- g. Colocar inmediatamente el disco de fluconazol y Voriconazol en placas petri correspondiente de forma equidistante.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición Nº 01

5.3 Colocación de los discos e incubación

- Dejar a temperatura ambiente el frasco con los discos durante 5-10 minutos.
- Extraer el disco del frasco con una pinza estéril de punta fina.
- Apoyar el disco en la superficie del agar, de la placa previamente inoculada por el método de hisopado y presionar suavemente en el centro del disco con la punta de la pinza.
- Distribuir los discos de modo que queden a 20 mm del borde de la placa, y separados entre sí por 40 mm.
- Dejar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos antes de ser colocado en la incubadora.
- Colocar la placa invertida en la incubadora a 37 ° C durante 24 horas.
- Si transcurridas las 24 horas de incubación, los halos no son claramente distinguibles, prolongar la incubación 24 horas más para dar lugar al crecimiento de especies de desarrollo más lento.

5.4 Control de calidad interno

a. Material de Referencia:

- Se emplearán como control de calidad las cepas de ***Candida parapsilosis*** ATCC 22019, ***Candida krusei*** ATCC 6258, ***Candida albicans*** ATCC 90028 y ***Candida tropicales*** ATCC 750; ya que poseen estabilidad genética y su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), ha sido determinada repetidamente. En la siguiente tabla se muestra los **Rangos de Aceptación**:


DISCO	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida tropicales</i> ATCC 750
Fluconazol	-	22-33	28-39	26-37
Voriconazol	16-25	28-37	31-42	26-40

b. Mantenimiento de material de referencia:

- Mantener el vial en agua destilada estéril a temperatura ambiente, entre 15° C a 25° C.
- Reactivar cada 06 meses en el medio de cultivo especializado.

c. Frecuencia de Uso:

- Utilizar cada vez que se realiza el método de ensayo.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

d. Criterio de aceptación o rechazo

▪ Aceptación:

1. Debe cumplir: Con el 100% de concordancia dentro de los RANGOS DE ACEPTACION establecidos para la cepas referenciales *Cándida krusei* ATCC 6258; *Cándida parapsilosis* ATCC 22019; *Cándida albicans* ATCC 90028 y *Cándida tropicales* ATCC 750.
2. Debe cumplir: Con la turbidez a la escala 0.5 de Mac Farland (equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL)
3. Debe cumplir: Con la distribución de los discos, según puntos equidistantes, correspondientes a los diferentes antifúngicos.

▪ Rechazo:

Si no cumple con los 03 criterios de aceptación referido en párrafo: “Aceptación” será rechazado.

e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno:

- Repetir el método de ensayo

6 INFORME DE RESULTADOS

- Medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición con una regla o calibre.
- La zona a medir es la definida por las colonias con desarrollo confluyente. Dentro de la zona de inhibición pueden desarrollar colonias con crecimiento inhibido que muestran un diámetro menor al de las colonias externas. Estas colonias deben ser consideradas dentro del halo de inhibición.


7 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Para la interpretación de los resultados se tendrá como referencia los puntos de corte establecidos para los discos de fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg), utilizados con ***Candida spp.***

DISCO	SENSIBLE	S-DD*	RESISTENTE
Fluconazol	>/= 19	15-18	</=14
Voriconazol	>/=17	14-16	</=13

8 FORMULARIOS

FOR-CNSP-259: Control de Calidad Interno y Reporte de Resultado del método difusión en discos para la determinación de susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriforme ***Candida spp.***”

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

9 ANEXOS

Anexo 01: Preparación del medio Mueller Hinton (MHM)

Anexo 02: Ficha de bioseguridad *Candida spp.*

ANEXO 01

PREPARACIÓN DEL MEDIO MUELLER HINTON (MHM)


Preparar 1 litro de Mueller Hinton según las instrucciones del fabricante, DIFCO, OXOID, agregar 20 g de glucosa y 100 uL de la solución stock de azul de metileno.

Mueller Hinton.....38 g
Glucosa.....20 g
Stock Azul de Metileno.....100 uL.
Agua destilada.....1000 mL

Autoclavar 15 minutos a 121°C y 15 libras. Dejar que llegue a 50°C y dispensar 25 mL por placa de Petri de modo de alcanzar 4mm ± 1mm.

Solución Stock de Azul de Metileno (SS-AM)

Para preparar la solución stock, agregar 0.1 g de Azul de Metileno a 20 mL de agua destilada (5 mg/mL) concentración final en el medio de cultivo SS-AM (5 µg/mL).

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

ANEXO N° 02

FICHA DE BIOSEGURIDAD *Candida spp.*

1 ALCANCE

Personal responsable del método estandarizado “DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD “*in vitro*” A LOS ANTIFUNGICOS” para *Candida spp.*, que lo procesa en el Laboratorio de Micología con nivel de bioseguridad 2 (NBS2).

2 PROCEDIMIENTO

Ficha de seguridad biológica para el manejo seguro de hongos ambientales

3 HOSPEDERO

Humanos de la boca al ano como levadura comensal.

4 FORMA DE TRANSMISION

Candida albicans se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal, urinario y genital humano; cuando se dan las condiciones necesarias como el caso de personas inmunocomprometidas, se convierte en un patógeno oportunista produciendo una infección endógena denominada “candidiasis”. Es infección exógena cuando las causas son los procedimientos quirúrgicos invasivos, el uso generalizado de terapias inmunosupresoras, así como el de antibióticos de amplio espectro, inyecciones narcóticas no estériles, catéteres en huéspedes inmunocomprometidas.

5 DOSIS INFECCIOSA

Desconocida.

6 PERIODO DE INCUBACIÓN

Variable


7 SUSCEPTIBILIDAD A DESINFECTANTES

Sensible al 1% de hipoclorito de sodio, 2% de glutaraldehido, formaldehido, moderadamente sensible al alcohol al 70% (fenol puede ser sustituido)

8 INACTIVACIÓN FISICA

Inactivado por calor húmedo (121 °C por al menos 15 minutos)

9 SOBREVIVENCIA FUERA DEL HOSPEDERO

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-100
	DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME <i>Candida spp.</i>	Edición N° 01

Sobrevive fuera del hospedero, especialmente en áreas húmedas y oscuras.

10 INMUNIZACIÓN - PROFILAXIS

Inmunización en el humano: Ninguna.
Profilaxis en el humano: Ninguna.

11 REQUERIMIENTOS DE CONTENCIÓN

Prácticas de Bioseguridad nivel 2, que contiene equipamiento y facilidades para la manipulación de este organismo.

12 ROPA DE PROTECCIÓN

Mandilón, guantes, gorros, botas.

13 DISPOSICIÓN

Descontaminación antes de la disposición final (esterilización, incineración, desinfección química).
