

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA
IN-VITRO DE TRES ESPECIES DE HONGOS CAUSANTES
DE QUERATITIS FÚNGICA: *Candida albicans*, *Aspergillus
fumigatus* y *Fusarium solani* DEL GEL OFTÁLMICO DE
VORICONAZOL**

Rubith Elena Morón Teves

TESIS

Para optar por el Título Profesional de

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Lima – Perú

2017

ASESORES DE TESIS

DRA. Q.F. PATRICIA HILDA LEÓN PAREDES

DRA. ANA BEATRIZ BUSTAMANTE RUFINO

JURADO CALIFICADOR

Dra. María Rivera Chira

PRESIDENTE

Dra. Susana Zurita Macalupu

VOCAL

Msc. Camilo Díaz Santibañez

SECRETARIO



*A mis queridos padres por su amor, cariño,
entrega y apoyo en la realización
de todas mis metas.*

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios por permitirme cumplir todos mis anhelos, guiar y bendecirme todos los días de mi vida.

A mis padres, por su infinito amor, apoyo incondicional y motivación, que nos permite culminar cada proyecto que emprendamos.

A mi familia, por siempre brindarme su cariño, respaldo y consejos, los cuales nos ayudan a enfrentar cada reto.

A la Dra. Patricia León, por apoyar la realización y término del presente proyecto de investigación, brindándome siempre sus conocimientos en el tema y apoyo.

A la Dra. Beatriz Bustamante, por permitirme realizar el proyecto en el laboratorio que tiene a cargo, siempre brindándome soporte técnico en el tema y apoyo incondicional en los ensayos realizados.

Un agradecimiento especial a la Srta. Susy Aranibal y al personal del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, por sus enseñanzas en las técnicas utilizadas, apoyo constante y buen humor, haciendo el ambiente del laboratorio cálido y enriquecido.

A la Dra. Patricia Herrera, por permitirme utilizar algunos equipos de laboratorio que permitieron culminar el proyecto.

A aquellos que hicieron posible la realización de la presente tesis.

A todos ellos, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Antecedentes.....	14
II. MARCO TEÓRICO	19
2.1. Generalidades.....	19
2.1.1. Hongos filamentosos.....	19
2.1.2. <i>Fusarium spp.</i>	19
2.1.3. <i>Aspergillus spp.</i>	19
2.1.4. Hongos levaduriformes.....	20
2.2. Definiciones.....	20
2.2.1. Concentración mínima inhibitoria.....	20
2.2.2. Queratitis fúngica.....	20
2.2.3. Antifúngico.....	21
2.2.3.1. Antibióticos.....	21
2.2.3.2. Azoles.....	22
2.2.3.3. Derivados imidazólicos.....	22
2.2.3.4. Derivados triazólicos.....	22
2.2.4. Forma farmacéutica.....	22
2.2.4.1.1. Geles.....	22
III. OBJETIVOS	24
3.2. Objetivo general.....	24
3.3. Objetivos específicos.....	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. MATERIALES.....	25
4.1.1. Cepas.....	25
4.1.2. Medios de cultivo y reactivos.....	25
4.1.3. Polvos puros.....	26
4.1.4. Equipos principales.....	26
4.1.5. Materiales de plástico y vidrio.....	26
4.2. MÉTODOS.....	27

4.2.1.	Conservación, almacenamiento y procesamiento de las cepas ...	27
4.2.2.	Medio de cultivo	28
4.2.3.	Preparación de la solución madre de Voriconazol.....	29
4.2.4.	Diluciones de Voriconazol.....	29
4.2.5.	Llenado de placas con Voriconazol.....	30
4.2.6.	Preparación de la solución stock de los excipientes.....	30
4.2.7.	Diluciones de los excipientes.....	31
4.2.8.	Llenado de placas con excipientes.....	31
4.2.9.	Preparación del inóculo: cepas control.....	32
4.2.10.	Preparación del inóculo: cepas de estudio.....	32
4.2.11.	Inoculación e incubación de las placas.....	34
4.2.12.	Control de pureza del cultivo	35
4.2.13.	Lectura de los resultados	35
4.2.14.	Interpretación de los resultados.....	35
V.	RESULTADOS	37
VI.	DISCUSIÓN	41
VII.	CONCLUSIONES	43
VIII.	RECOMENDACIONES	44
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X.	ANEXOS	50

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1:** Incidencia de agentes causantes de queratitis micótica
- TABLA 2:** Esquema para la preparación de una serie de diluciones de antifúngicos insolubles en agua para ser utilizado en la prueba de sensibilidad en caldo.
- TABLA 3:** Esquema para la preparación de una serie de diluciones de excipientes solubles en agua para ser utilizado en la prueba de sensibilidad en caldo.
- TABLA 4:** Evaluación del MIC en levaduras frente al antifúngico a las 24 y 48 horas
- TABLA 5:** Análisis de varianza del MIC en levaduras frente al antifúngico a las 24 horas
- TABLA 6:** Análisis de varianza del MIC en levaduras frente al antifúngico a las 48 horas
- TABLA 7:** Evaluación del MIC en filamentos frente al antifúngico a las 48 horas
- TABLA 8:** Evaluación del MIC en levaduras frente a los excipientes a las 24 y 48 horas
- TABLA 9:** Evaluación del MIC en filamentos frente a los excipientes a las 48 horas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Fusarium solani* ATCC® 36031

FIGURA 2: *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305

FIGURA 3: *Candida albicans* ATCC® 90028

FIGURA 4: Crecimiento de levaduras en CHROMagar™ Candida

FIGURA 5: Lectura de placas con antifúngico a las 24 horas de incubación –
Levaduras

FIGURA 6: Lectura de placas con antifúngico a las 48 horas de incubación –
Levaduras

FIGURA 7: Lectura de placas con antifúngico a las 48 horas de incubación –
Filamentos

FIGURA 8: Lectura de placas con excipientes a las 24 horas de incubación –
Levaduras

FIGURA 9: Lectura de placas con excipientes a las 48 horas de incubación –
Levaduras y Filamentos

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1:** Disoluciones seriadas y llenado de placas
- ANEXO 2:** Lectura de placas con Voriconazol – Levaduras
- ANEXO 3:** Lectura de placas con Voriconazol – Filamentos
- ANEXO 4:** Lectura de placas con excipientes – Levaduras y Filamentos
- ANEXO 5:** Información del producto: Cepas ATCC

LISTA DE ABREVIATURAS

Agar YEPD	Yeast extract peptone dextrose agar
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Control de crecimiento
CE	Control de esterilidad
MIC	Concentración mínima inhibitoria (CIM)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
INO	Instituto Nacional de Oftalmología
MOPS	Ácido morfolino propanosulfónico
NaOH	Hidróxido de sodio
PDA	Papa dextrosa agar
SB	Sabouraud dextrosa agar
UFC	Unidades Formadores de Colonias

RESUMEN

En las últimas décadas, la incidencia de queratitis producida por hongos se ha incrementado, siendo la principal causa de complicaciones oculares (ceguera). Los estudios y experiencia de los médicos oftalmólogos sugieren que la nueva generación de triazoles, dentro de ellas el Voriconazol, representa una poderosa herramienta para el tratamiento de queratitis micótica. Diversos estudios comprueban las ventajas de Voriconazol por vía intravenosa (solución para inyección), oral (comprimidos) y tópica (como solución), pero ninguna sobre vía tópica en gel.

El gel oftálmico de Voriconazol al ser una nueva forma farmacéutica, no existen estudios que evalúen la susceptibilidad antifúngica. Se realizó una prueba de sensibilidad in-vitro utilizando la técnica de microdilución en caldo, evaluando la concentración del inóculo, temperatura y los tiempos de incubación de tres cepas ATCC con mayor incidencia en queratitis fúngica.

Los resultados encontrados indican que *Candida albicans* ATCC® 90028 y *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 son susceptibles al gel oftálmico de Voriconazol. Caso contrario, con *Fusarium solani* ATCC® 36031, quien muestra una fuerte resistencia frente a Voriconazol. Por otro lado, las lecturas obtenidas a las 24 y 48 horas para levaduras, muestran valores similares.

Se concluye que una cepa de estudio resultó resistente al gel oftálmico de Voriconazol (*Fusarium solani* ATCC® 36031).

ABSTRACT

In recent decades, the incidence of fungal keratitis has increased the main cause of ocular complications (blindness). Studies and experience of ophthalmologists suggest that the new generation of triazoles, voriconazole within them represents a powerful tool for the treatment of fungal keratitis. There are a lot of studies showing the benefits of the use of intravenous voriconazole (solution for injection), oral (tablet) and topical (as a *solution*), but none on topical gel route.

As Voriconazole ophthalmic gel is a new pharmaceutical form, there are no studies that evaluate the antifungal susceptibility. A sensitivity in vitro test was performed using the broth microdilution technique, evaluating the concentration of inoculum, temperature and incubation times of three ATCC strains with higher incidence in fungal keratitis.

The results indicate that *Candida albicans* ATCC® 90028 and *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 are susceptible to voriconazole ophthalmic gel. Otherwise it happens with *Fusarium solani* ATCC® 36031 who shows strong resistance to voriconazole. Furthermore, the readings obtained at 24 and 48 hours for yeast show similar values.

As a conclusion, one strain is resistant to Voriconazole ophthalmic gel (*Fusarium solani* ATCC® 36031).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 . Antecedentes

La queratitis infecciosa posee una elevada morbilidad y altos índices de complicación, llegando a ser la causa principal de ceguera. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la ceguera corneal (resultado final de la queratitis infecciosa) como una causa importante de discapacidad visual en todo el mundo.¹

Queratitis es un proceso inflamatorio de la córnea y los tejidos que recubren la pupila e iris. Clínicamente se caracteriza por un proceso inflamatorio, ulceración y necrosis del estroma. Un tratamiento inadecuado puede involucrar una complicación infecciosa. Esta infección puede estar causada por bacterias, virus, hongos y parásitos.² Como lo muestra un estudio realizado en Paraguay (2003-2006), en el cual determinan que el agente etiológico con mayor frecuencia aislado de los pacientes con queratitis infecciosa es de origen bacteriano (44%), seguido por el de origen fúngico (17%) y combinación de hongos y bacterias (11%).³

Como se mencionó anteriormente, los hongos no son el agente etiológico de mayor frecuencia en queratitis infecciosa. Sin embargo, existe una alta diversidad clínica en cuanto a especies patógenas y dificultad en la elección del tratamiento para cada caso clínico por la difícil identificación del patógeno.⁴

La queratitis micótica es un problema significativo en países desarrollados como en vías de desarrollo. Debido a la existencia de diversos factores de riesgo, por ejemplo: traumas (producidos especialmente por hojas), enfermedad en la superficie ocular, queratoplastia, uso crónico o tópico de esteroides y antibióticos (mala utilización), inmunodepresión, etc. Actualmente, la utilización de lentes de contacto es un potencial factor de riesgo de queratitis fúngica mundialmente.⁵

Históricamente, la queratitis fúngica es una enfermedad común en climas cálidos, tropicales, sub-tropicales, como ocurre en regiones de la India, China,

Irán, Ghana y Brasil; y totalmente infrecuentes en climas más fríos.^{6,7} Así tenemos que al Sur de la India, la incidencia de queratitis fúngica representa 30 - 40% de cultivos positivos.⁸ Sin embargo, el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) recientemente ha reportado un brote de al menos 130 casos confirmados de queratitis por *Fusarium* asociado a la utilización de lentes de contacto. El CDC encontró una relación entre las infecciones y el uso particular de la solución de lentes de contacto (***RENu with Moisture Loc, Bausch & Lomb Rochester, NY***), que posteriormente fue retirado de los Estados Unidos y del mercado mundial.⁹

Dentro de los casos de queratitis micótica, el agente patológico de mayor frecuencia son los hongos filamentosos porque éstos crecen preferentemente en climas cálidos. En otros países, se ha descrito una incidencia del 6 a 82% para *Fusarium*¹⁰, 8 a 25% para *Candida*, 2 a 29% para *Penicillium*.¹¹ En países de América Latina se tiene a *Fusarium spp.* como agente patológico con mayor frecuencia en queratitis fúngica¹²; Colombia, Paraguay y Estados Unidos se ha descrito a *Aspergillus sp.*¹³

Se tiene alrededor de 56 géneros y 105 especies patógenas de hongos causantes de queratitis micótica. El espectro patogénico de queratitis fúngica varía de países a regiones como resultado del clima, medio ambiente, condiciones naturales peculiares de la región, etc.¹⁴ Tal es así, que los hongos patógenos predominantes en India son *Aspergillus sp.*, seguido de *Curvularia sp.*¹⁵ En Brasil, se tiene a *Fusarium sp.*, seguido de *Candida* y *Aspergillus sp.*¹⁶ En Reino Unido, las queratitis encontradas son atribuidas a especies de *Candida*.¹⁷ Al noroeste de China, se identificó a *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Candida sp.*¹⁸

Un estudio interno realizado por el Instituto Nacional de Oftalmología (INO) en Perú muestra que la incidencia local de agentes causantes de infecciones oculares micóticas es producida principalmente por hongos filamentosos y levaduriformes, dentro de ellos destacan *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.¹⁹ (Tabla 1)



Tabla 1: Incidencia de agentes causantes de Queratitis micótica

Fuente: Laboratorio de Microbiología – 2011-2012 – Instituto Nacional de Oftalmología
Lima – Perú

Establecer el tratamiento adecuado a las infecciones micóticas sigue siendo un desafío, debido a diversos factores que dificultan el correcto diagnóstico como: identificación incorrecta del agente etiológico (crecimiento de hongos), diagnóstico tardío, ausencia de agentes antifúngicos eficaces o de baja penetración terapéutica, etc.²⁰ Los tratamientos comunes para endoftalmitis fúngica son de tipo intravenosa y/o intravitreal con Anfotericina B. En ocasiones, el tratamiento se combina con una vitrectomía, debido a la débil penetración del fármaco intraocularmente. Por otro lado, se utiliza también Fluconazol (triazol 1ra generación), Itraconazol, Natamicina tópica. Sin embargo, no presentan una buena respuesta frente a algunos agentes fúngicos patógenos.²¹

Hay informes prometedores que indican que la nueva generación triazoles puede superar significativamente a las terapias existentes. El triazol inhibe la enzima lanosterol 14- α -demetilasa (esencial en la biosíntesis del ergosterol). Los nuevos agentes antifúngicos, incluyendo Ravuconazol, Posaconazol y Voriconazol son

derivados sintéticos del Fluconazol, con un espectro más amplio en cuanto a actividad.²²

El Voriconazol es un agente antifúngico triazólico de segunda generación, con amplia potencia y espectro. Tiene una biodisponibilidad oral de 96% y las concentraciones en plasma alcanzan picos de 2 a 3 horas luego de la dosis oral. Estudios in vitro muestran el amplio espectro del Voriconazol frente *Aspergillus sp*, *Candida sp*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Curvularia sp*, *Fusarium sp*, *Histoplasma capsulatum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium sp*, *Scedosporium sp*, etc.^{23, 24, 25,26}

Como se mencionó anteriormente, Voriconazol presenta una excelente penetración ocular, efectivo tratamiento para endoftalmitis fúngica. Puede ser utilizado mediante inyección intraocular con un grandioso resultado. Mejora resultados a los obtenidos con la utilización de Anfotericina B.

Un estudio demostró la seguridad en la utilización de Voriconazol (inyección intravitreal) como agente antifúngico, ya que concentraciones altas de hasta 25µg/mL de Voriconazol a nivel intravitreal no causa electroretinografía o anomalía histológica en la retina de las ratas.²⁶

Estudios recientes señalan que la utilización de Voriconazol 1% por vía tópica alcanza altas concentraciones en humor vítreo. Así tenemos, un primer caso en el que se aplicó una solución de Voriconazol 1% vía tópica cada 2 horas durante un día (antes de la cirugía de vitrectomía). Los resultados indican que la concentración en humor acuoso y vítreo es de 6,49µg/mL y 0.16µg/mL respectivamente, demostrando que el fármaco penetra con mayor profundidad la córnea. Estas concentraciones se encuentran por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias de los cuales el 90% del aislado es inhibido (MIC90), para un amplio espectro de hongos y mohos, incluidos *Aspegillus*, *Fusarium* y *Candida sp*.²⁷

Otro caso relevante, se encontró en la aplicación de Voriconazol 1% por vía tópica en intervalos de 1 hora, los niveles de Voriconazol en humor acuoso medido por el bioensayo de difusión en agar fue de 3,2 µg/mL, representando un 160% del nivel en plasma (2µg/mL), valores significativamente mayores encontradas en la cámara anterior. Este incremento en la absorción pudo deberse adicionalmente a la realización de la queratoplastia penetrante, el cual crea un ambiente favorable para la absorción de Voriconazol tópico.²⁸

La revisión bibliográfica y la experiencia de los médicos oftalmólogos sugieren que la nueva generación de triazoles, dentro de ellas el Voriconazol, representa una poderosa herramienta para el tratamiento de queratitis micótica. Esto ya significa un gran avance en cuanto a las terapias de primera elección en queratitis fúngica. La investigación a realizar es de gran relevancia, ya que se evaluará una nueva forma farmacéutica no antes elaborada. Como se muestra en los antecedentes, existen amplios estudios mundiales que indican las ventajas de la utilización de Voriconazol por vía intravenosa, oral y tópica (como solución), pero ninguna sobre la vía tópica (gel). Con ello, se pretende evaluar la susceptibilidad antifúngica de la nueva forma farmacéutica existente (gel de Voriconazol).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

2.1.1. Hongos filamentosos

Presentan un tallo (cuerpo) formados por filamentos largos de células unidas, las cuales son denominadas hifas, que pueden crecer hasta proporciones inmensas. Las hifas generalmente contienen tabiques que las dividen en unidades separas similares a las células mono nucleadas (un núcleo), llamadas tabicadas.

En otros casos, los hongos pueden no contener tabiques y aparecen solo como una célula continúa y larga con muchos núcleos (cenocíticas).²⁹

2.1.2. *Fusarium spp.*

Hongo filamentoso, hialino, septado, el cual se puede encontrar como saprófito del suelo o como patógeno de plantas y animales. La forma y el tamaño de los conidios es la característica principal para su identificación. Los conidios están dispersos en el micelio aéreo o en esporodoquios. Los macroconidios son curvados, pluriseptados. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada. (*Figura 1*)

2.1.3. *Aspergillus spp.*

Hongo filamentoso que vive en el medioambiente. Sus reservorios son la tierra de plantas ornamentales, basurales, excavaciones y ductos de aire acondicionado. La forma principal de infecciones en humanos y animales es por vía respiratoria, de hecho, el ser humano está aspirando constantemente miles de conidias de *Aspergillus*, pero el organismo se encarga de filtrarlas y eliminarlas, caso contrario en pacientes inmunodeprimidos no son capaces de eliminarlas.²⁹

En el género de *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula.²⁹ (Figura 2)

2.1.4. Hongos levaduriformes

Hongos unicelulares no filamentosos de forma esférica u oval característica. Distribuidas ampliamente en la naturaleza, con frecuencia aparecen cubriendo las frutas y hojas con una cubierta pulverulenta blanca.

Algunas levaduras producen brotes que no se separan y forman una cadena corta de células, llamadas pseudohifas. Por ejemplo, *Candida albicans* se adhiere a las células epiteliales humanas como levaduras, pero para poder invadir los tejidos profundos suele usar la formación de pseudohifas.²⁹ (Figura 3)

2.2. Definiciones

2.2.1. Concentración mínima inhibitoria

La concentración más baja de un agente antimicrobiano que produce una reducción específica visible en el crecimiento de un microorganismo en un medio de crecimiento favorable.

2.2.2. Queratitis fúngica

La queratitis es una inflamación de la córnea producida por diversos agentes: bacterias, virus, hongos o parásitos. La queratitis infecciosa es un problema importante de salud pública, que no presenta signos significativos diferenciales entre una inflamación corneal secundaria (producto de un traumatismo) y una reacción de hipersensibilidad o enfermedad inmunitaria con una queratitis infecciosa propiamente.

La queratitis fúngica puede ser causado por una gran variedad de hongos y levaduras y es poco frecuente respecto a la queratitis viral o bacteriana.

2.2.3.2. Azoles

Los azoles son agentes antifúngicos que inhiben la enzima 14- α esterol demetilasa. Provocando una reducción de la síntesis del ergosterol y una acumulación del 14- α metil esterol interrumpiendo la formación de las cadenas de fosfolípidos de la membrana.³³

2.2.3.2.1. Derivados imidazólicos

Incluye al ketoconazol, clorimazol, miconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, sertaconazol y sulconazol.

El ketoconazol tiene un amplio espectro contra hongos levaduriformes como *C. neoformans*, especies de *Candidas*, *H. capsulatum* y una gran variedad de dermatofitos.

2.2.3.2.2. Derivados triazólicos

Tenemos a fluconazol e itraconazol. Dentro de los triazoles de segunda generación, se tiene a voriconazol, ravuconazol y posaconazol. Los azoles de segunda generación cuentan con un amplio espectro y menor nefrotoxicidad en comparación con los antifúngicos antiguos más utilizados.

En nuestro país, actualmente se encuentra registrado itraconazol cápsulas, en su única forma farmacéutica.

2.2.4. Forma farmacéutica

2.2.4.1. Geles

Semisólidos en suspensión (sistema coloidal) de pequeñas partículas inorgánicas u orgánicas atravesadas por un líquido. Los geles se clasifican como sistema monofásico o bifásico. Los geles monofásicos contienen

macromoléculas orgánicas distribuidas uniformemente a través de un líquido de tal forma que no hay una separación visible entre las macromoléculas dispersas y el líquido.

Los geles monofásicos pueden contener macromoléculas naturales o sintéticas (por ejemplo: Carbómero, hipromelosa o almidón) o gomas naturales, como tragacanto (también llamados mucilagos). La base para la preparación de geles generalmente es acuosa; sin embargo, alcoholes y aceites pueden ser usados como fase continua. Los geles pueden ser administrados por vía tópica o mucosal.³⁴

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar la susceptibilidad antifúngica del gel oftálmico de Voriconazol en tres especies de hongos ATCC causantes de queratitis fúngica: *Candida albicans* ATCC[®] 90028, *Aspergillus fumigatus* ATCC[®] 204305 y *Fusarium solani* ATCC[®] 36031.

3.2. Objetivo específico

- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del hongo levaduriforme: *Candida albicans* ATCC[®] 90028 frente al gel oftálmico de Voriconazol.
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los hongos filamentosos: *Aspergillus fumigatus* ATCC[®] 204305 y *Fusarium solani* ATCC[®] 36031 frente al gel oftálmico de Voriconazol.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. *Cepas*

Las cepas de estudio seleccionadas fueron obtenidas a partir del American Type Culture Collection (ATCC), *Candida albicans* ATCC[®] 90028, *Aspergillus fumigatus* ATCC[®] 204305 y *Fusarium solani* ATCC[®] 36031*.

Se utilizó como cepas control a *Candida krusei* ATCC[®] 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019.

*Es importante señalar que la cepa *Fusarium solani* ATCC[®] 36031 se aisló de un paciente con úlcera corneal del Estado de Anambra, Nigeria.

4.1.2. *Medios de cultivo y reactivos*

Medio RPMI-1640, con L-glutamina sin bicarbonato de sodio (HIMEDIA AT028-1L)

Agar Sabouraud Dextrosa (Microgen)

Agar Papa Dextrosa (Microgen)

Ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)

BBLTM Chromagar[™] Candida (BD)

Cloranfenicol

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)

NaOH 1N

Solución salina (NaCl 0,85%)

Agua destilada

Tween 20

Escala 0,5 de Mc Farland (Remel Lenexa Kansas)

4.1.3. Polvos puros

Voriconazol, potencia: 99, 3% (WuxiHexiaChemical Co., China)

Ácido poliacrílico (Sigma-Aldrich)

Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Zibo Qianhui Fine Chemical CO., Ltd - China)

4.1.4. Equipos principales

Balanza analítica

Balanza

Microscopio (Carl Zeiss: Axiostar plus)

Congelador (Thermo/ Forma Scientific 8525 Series Bio-freezer)

Equipo de incubación (BarnsteadLab Line)

Espectrofotómetro (Genesys 20)

4.1.5. Materiales de plástico y vidrio

Placa de 96 pocillos fondo en “U” con tapa, estéril (BD Falcón)

Tubos de centrifuga de polietileno 15mL graduado estéril (Kartel)

Filtro para vacío de 1000 mL – tamaño de poro 0,20µm (Nalgene)

Tubo de ensayo de vidrio 13 x 100 mm estéril

Tubo de ensayo de vidrio 16 x 125 mm con tapa estéril

Placas Petri estériles desechables 90 x15 (Normax/ Portugal)

Asa de siembra de acero inoxidable Ø 3mm y descartables estériles (Premiere)

Pipeta de plástico desechable estéril de 2mL, 5mL y 10mL (BD Falcón)

Pipeta de transferencia graduada de 3mL estéril (Simport/ Canada)

Puntas de pipeta de 10µL, 200µL, 1000µL (Technoplast)

4.2. MÉTODOS

El presente estudio se realizó el 2013, la concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó aplicando la técnica estandarizada de microdilución en caldo descrito en el manual de referencia M27-A2³⁰ y M38-A2³¹ de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), edición vigente. Como medio de cultivo se utilizó RPMI-1640 con L-glutamina sin bicarbonato de sodio (HIMEDIA AT028-1L).

Se determinó la CIM evaluando cinco repeticiones (diferentes días) por duplicado cada vez de cada cepa de estudio siguiendo los parámetros proporcionados por la CLSI.

4.2.1. *Conservación, almacenamiento y procesamiento de las cepas*

Las cepas control y de estudio para la determinación de susceptibilidad antifúngica de levaduras se encuentran suspendidas y conservadas en viales 1.5 mL con agar YEPD (Yeast extract peptone dextrose agar), almacenadas a -20°C. Para comprobar la viabilidad y hacer uso de las mismas, éstas se descongelan previamente a temperatura ambiente hasta que la suspensión (medio + cepas) se encuentre en estado líquido. Luego se siembra en agar Sabouraud dextrosa (SB) con cloranfenicol a 35°C durante 48 horas o hasta la visualización de crecimiento. Obtenido el crecimiento se realiza la observación morfológica macroscópica y microscópica, como la determinación de la pureza mediante la visualización de colonias coloreadas y morfología utilizando un medio selectivo que contiene sustratos cromogénicos (CHROMagarTM Candida), visualizado en la *figura 3 y 4*.

Descartando cualquier tipo de contaminación mediante las pruebas anteriormente mencionadas se replica una vez, por duplicado en el mismo medio de cultivo y se incuban a 35°C por 24 horas. Se conservan a temperatura ambiente y se sella con Parafilm M hasta el momento de la realización del estudio.

Por otro lado, las cepas de estudio para la determinación de susceptibilidad antifúngica de filamentos se encuentran conservadas en forma de sedimento

liofilizado. Se dejó el envase a temperatura ambiente para que se equilibre, luego se re-constituye el liofilizado con el líquido hidratante que se encuentra en el mismo envase. Obtenida la suspensión se procedió a sembrar en placas petri y dos tubos con medio de papa dextrosa agar (PDA) a 35°C durante 7 días para *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305; a 35°C durante 72 horas y posteriormente a 28°C hasta completar los 7 días para *Fusarium solani* ATCC® 36031. Este proceso puede implicar continuar con la incubación, bajo las condiciones mencionadas, hasta la visualización del crecimiento.

Obtenido el crecimiento y esporulación de las colonias, se realiza la identificación morfológica macroscópica y microscópica, como se observa en *figura 1 y 2*. Son conservados a temperatura ambiente hasta el momento de la realización del estudio, cabe mencionar que, como precaución de una posible contaminación externa, estos cultivos fueron cubiertos con Parafilm M.

4.2.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640, con L-glutamina sin bicarbonato de sodio. Este medio requiere ser tamponado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) en una concentración final de 0,165 M a pH 7,0. Para la preparación de un litro de medio se utiliza pesando las siguientes cantidades:

<i>RPMI-1640</i>	10,4 g
<i>MOPS</i>	34,53 g
<i>Agua destilada</i>	1000 mL

Disolver el medio y el tampón en 900 mL de agua destilada hasta su completa disolución. Se ajusta el pH a $7,0 \pm 0,1$ a 25°C utilizando NaOH 1N y enrasar con agua destilada para un volumen final de un litro. El medio es esterilizado mediante filtración por membrana, utilizando filtro para vacío de 1000 mL – tamaño de poro 0,20µm y almacenado a +4°C hasta su utilización.

4.2.3. Preparación de la solución madre de Voriconazol

Se empleó polvo puro de Voriconazol (WuxiHexiaChemical Co., China) con una potencia: 99,3%. La solución madre o solución stock se preparó a una concentración cien veces superior a la concentración más alta a ser evaluada (1600 µg/mL), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen (mL)} \times \text{Concentración (µg/mL)}}{\text{Potencia de ensayo (µg/mg)}}$$

El Voriconazol al ser un antifúngico insoluble en agua, se utilizó como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2.4. Diluciones de Voriconazol

La concentración ensayada se encuentra entre 16 – 0,0313 µg/mL (concentración final luego de la inoculación). A partir de la solución madre que tiene una concentración de 1600 µg/mL se preparó una serie de diluciones seriadas dobles utilizando como diluyente DMSO, detallados en el *anexo 1* y en la siguiente tabla:

DILUCIÓN DEL ANTIFÚNGICO INSOLUBLES EN AGUA					
Paso N°	Concentración(µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	Solvente DMSO* (mL)	Concentración intermedia (µg/mL)
1	1600	Stock			1600
2	1600	Stock	0,5	0,5	800
3	1600	Stock	0,25	0,75	400
4	1600	Stock	0,25	1,75	200
5	200	Paso 4	0,5	0,5	100
6	200	Paso 4	0,25	0,75	50
7	200	Paso 4	0,25	1,75	25
8	25	Paso 7	0,5	0,5	12,5
9	25	Paso 7	0,25	0,75	6,25
10	25	Paso 7	0,25	1,75	3,12

Tabla 2: Esquema para la preparación de una serie de diluciones de antifúngicos insolubles en agua para ser utilizado en la prueba de sensibilidad en caldo. *Dimetil sulfóxido (DMSO).
Manuales de Referencia: CLSI M27-A2 y M38-A2

A las soluciones obtenidas en el paso anterior se le realiza una última dilución 1:50 con medio RPMI-1640, obteniendo una concentración de antifúngico dos veces mayor a la concentración final (32 – 0,0626 µg/mL).

4.2.5. Llenado de placas con Voriconazol

Se utilizó placas estériles transparentes de 96 pocillos con tapa, fondo en “U” con ocho filas (A-H) y doce columnas (1-12). Haciendo uso de una pipeta multicanal llenar con 100 µL de cada concentración de antifúngico (32 – 0,0626 µg/mL) en cada columna de la placa, empezando por la de mayor concentración (2A-2H) hasta la de menor concentración (11A-11H). La columna 1A-1H se utilizó como control de esterilidad (CE) del medio de cultivo, sólo contienen medio RPMI-1640 y la última columna 12A-12H se usó como control de crecimiento (CC) de las cepas, contienen una dilución 1:50 de DMSO con RPMI-1640 (*Anexo 1*).

Una vez terminado el proceso de llenado, las placas fueron selladas con Parafilm M, envueltas con papel aluminio para minimizar la evaporación del líquido y congeladas a -80°C.

4.2.6. Preparación de la solución stock de los excipientes

Se utilizó Ácido poliacrílico (Sigma-Aldrich) e Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Zibo Qianhui Fine Chemical CO., LTD - China) en polvo. El procedimiento utilizado es la misma a la ensayada con el antifúngico (manual de referencia), debido a que no se cuenta con un procedimiento establecido para compuestos diferentes a antifúngicos. Con ello se determinó y comparó la presencia o ausencia de actividad antifúngica.

La *solución stock* se preparó a una concentración cien veces superior a la concentración más alta a ser evaluada (1600 µg/mL), utilizando como disolvente agua destilada estéril.

4.2.7. Diluciones de los excipientes

La concentración ensayada se encuentra entre 16 – 0,0313 µg/mL (concentración final luego de la inoculación). A partir de la *solución stock* que tiene una concentración de 1600 µg/mL se preparó una serie de diluciones utilizando como diluyente agua destilada estéril, como se detalla en la tabla a continuación:

DILUCIÓN DE EXCIPIENTES					
Paso N°	Concentración(µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	Solvente Agua destilada (mL)	Concentración intermedia (µg/mL)
1	1600	Stock			1600
2	1600	Stock	0,5	0,5	800
3	1600	Stock	0,25	0,75	400
4	1600	Stock	0,25	1,75	200
5	200	Paso 4	0,5	0,5	100
6	200	Paso 4	0,25	0,75	50
7	200	Paso 4	0,25	1,75	25
8	25	Paso 7	0,5	0,5	12,5
9	25	Paso 7	0,25	0,75	6,25
10	25	Paso 7	0,25	1,75	3,12

Tabla 3: Esquema para la preparación de una serie de diluciones de excipientes solubles en agua para ser utilizado en la prueba de sensibilidad en caldo.
Manuales de Referencia: CLSI M27-A2 y M38-A2

A las soluciones obtenidas en el paso anterior se le realiza una última dilución 1:50 con medio RPMI-1640. Este procedimiento se realizó de igual manera para ambos excipientes.

4.2.8. Llenado de las placas con excipientes

Se utilizó placas estériles transparentes de 96 pocillos con tapa, fondo en “U” con ocho filas (A-H) y doce columnas (1-12). Las filas comprendidas entre A-D fueron utilizadas para llenar con el excipiente Ácido poliacrílico y las filas E-H se llenó con el excipiente Hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Utilizando una pipeta multicanal se procede a llenar con 100 µL de cada concentración de excipiente (32 – 0,0626 µg/mL) en cada columna de la placa, empezando por la concentración mayor (2A-2H) hasta llegar a la concentración menor (11A-11H). La columna 1A-1H se utilizó como control de esterilidad (CE) del medio de cultivo, sólo contienen el medio RPMI-1640 y la última columna 12A-12H

se usó como control de crecimiento (CC) de las cepas, contienen una dilución 1:50 de agua destilada estéril con RPMI-1640 (*Anexo I*).

Una vez terminado el proceso de llenado de las placas, se selló con Parafilm M, envolvió con papel aluminio para minimizar la evaporación del líquido y congeló a -80°C hasta el día del ensayo.

4.2.9. Preparación del inóculo: cepas control

Se utilizó dos cepas de referencia como controles: *Candida krusei* ATCC® 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019. Se siembra en zigzag en un tubo con agar Sabouraud dextrosa (SB) e incuba a 35°C durante 24 horas.

El inóculo se prepara tomando 5 colonias (≥ 1 mm de diámetro) de 24h de edad y suspendió en 5 mL de solución salina estéril 0.85% (0,145 mol/L) en tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapa de algodón estéril.

La suspensión resultante fue agitada durante 20 segundos en un vórtex y ajustada a una densidad igual al tubo N° 0,5 del estándar de turbidez de McFarland (*comparación visual*). Con ello obtenemos una suspensión de levaduras entre 1×10^6 y 5×10^6 células/mL.

Adicionalmente, se realiza una *comprobación cuantitativa*, para garantizar que la concentración del inóculo se encuentra dentro del rango requerido. Se realiza mediante el conteo de las levaduras en la cámara Neubauer (10 μ L) de una dilución 1:100 de la solución ajustada en el paso anterior con solución salina estéril.

Obtenida la suspensión ajustada (*solución stock de levaduras*) se diluye 1:1000 con medio RPMI-1640, homogeniza. Con ello obtenemos una concentración de levaduras de 1×10^3 y 5×10^3 células/mL.

4.2.10. Preparación del inóculo: cepas de estudio

a. Levadura

La cepa *Candida albicans* ATCC® 90028 fue sembrada en zigzag en un tubo con agar SB e incubó a 35°C durante 24 horas, de la muestra conservada a temperatura ambiente.

Se preparó el inóculo tocando 5 colonias (≥ 1 mm de diámetro) de 24h de edad y suspendió en 5 mL de solución salina estéril 0.85% en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100 mm con tapa de algodón. La suspensión obtenida fue agitada durante 20 segundos en un vórtex y ajustada a una densidad igual al tubo N° 0,5 del estándar de turbidez de McFarland (*comparación visual*). Con ello se obtiene una suspensión de levaduras entre 1×10^6 y 5×10^6 células/mL.

Por otro lado, de forma complementaria se realizó una *comprobación cuantitativa*, mediante el conteo de las levaduras en la cámara Neubauer (10 μ L) de una dilución 1:100 de la solución ajustada en el paso anterior con solución salina estéril. Con ello aseguramos que la suspensión obtenida se encuentra en la concentración indicada.

Finalmente, con la suspensión ajustada (*solución stock de levaduras*) se diluyó 1:1000 con medio RPMI-1640, obteniendo así una concentración de levaduras entre 1×10^3 y 5×10^3 células/mL. Esta suspensión final es la utilizada para inocular en las placas que contienen antifúngico y excipientes.

b. Filamentos

Como cepas de estudio se tomó a *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 y *Fusarium solani* ATCC® 36031 del cultivo que se conservó a temperatura ambiente. Se sembró en placas petri con papa dextrosa agar (PDA), durante 7 días a 35°C para *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305, mientras que para *Fusarium solani* ATCC® 36031 se incubó durante 72 horas a 35°C y a 28°C hasta completar los 7 días.

El inóculo de *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 se prepara tocando las conidias de la superficie del cultivo de 7 días de edad con un aza de siembra embebido en Tween 20 y es suspendido en 4 mL de solución salina estéril 0.85% en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100 mm con tapa de algodón. La suspensión resultante fue agitada durante 30 segundos en un vórtex y se deja sedimentar durante 4 minutos. Transferir el sobrenadante a otro tubo de vidrio estéril y se agita por 15 segundos.

Se procede a leer y ajustar la densidad de la suspensión de conidias y esporangiósporas a una densidad óptica (DO) de 0,09 a 0,13 a una longitud de onda de 530 nm. (*Solución stock de filamentos AF*)

Por otro lado, el inóculo de *Fusarium solani* ATCC® 36031 se prepara cubriendo las colonias esporuladas con 5 mL de solución salina estéril 0.85% y con cuidado se procedió a frotar con la punta del asa de siembra la superficie del cultivo de 7 días de edad. Luego con sumo cuidado se transfirió la mezcla resultante de conidias, esporangiósporas y fragmentos de hifa a un tubo de centrifuga de polietileno 15mL graduado estéril cubierto por una gasa estéril, el cual hace de filtro de toda la solución resultante (con la finalidad de retener las macroconidias) y se deja sedimentar durante 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio estéril de 13 x 100 mm con tapa de algodón, se agita por 15 segundos.

Luego proceder a leer y ajustar densidad de la suspensión de conidias y esporangiósporas a una densidad óptica (DO) de 0,15 a 0,17 a una longitud de onda de 530 nm. (*Solución stock de filamentos FS*)

Finalmente, con las suspensiones ajustadas (*solución stock de filamentos AF y FS*) se realiza una dilución 1:50 con medio RPMI-1640, obteniendo así una concentración de filamentos entre $0,4 \times 10^4$ y 5×10^4 UFC/mL. Esta suspensión final es la utilizada para inocular en las placas que contienen antifúngico y excipientes.

4.2.11. Inoculación e incubación de las placas

El día del ensayo, las placas se descongelaron a temperatura ambiente y se inoculan con 100 µL de la suspensión final del inóculo a partir de la segunda columna hasta la décimo segunda columna. La primera columna se deja al final para llenarlo con 100µL del medio RPMI-1640 utilizado en la preparación de las diluciones [*control de esterilidad (CE)*].

Las placas fueron incubadas a 35°C sin agitación durante 24 y 48 horas, para levaduras y filamentos solo a 48 horas.

4.2.12. Control de pureza del cultivo

a. Levadura

Se siembra 100 μ L de la suspensión final utilizada para inocular las placas con antifúngico y excipientes, en placas petri con agar SB y se incuba a 35°C por 48 horas, con el objetivo de comprobar la viabilidad del inóculo sembrado en las placas de estudio, se logra visualizando el crecimiento en las placas Petri con SB.

b. Filamentos

Se siembra 10 μ L de una dilución 1:10 de la solución ajustada espectrofotométricamente en placas petri con agar SB. Se incuba a $28 \pm 5^\circ\text{C}$ y se observa a diario hasta la visualización del crecimiento de las colonias, con el objetivo de determinar el inóculo sembrado en las placas de estudio.

4.2.13. Lectura de los resultados

La lectura se realizó en dos oportunidades, a 24 horas y 48 horas para levaduras y para filamentos a 48 horas. La lectura se realiza de manera visual utilizando un espejo invertido, observando la presencia o ausencia de crecimiento.

4.2.14. Interpretación de los resultados

El crecimiento de cada pocillo fue comparado con aquel que contenía el control de crecimiento sin antifúngico y los resultados se valoraron mediante una puntuación numérica del 0 al 4, siguiendo la siguiente escala:

- 0 = ópticamente claro**, sin crecimiento fúngico visible (100% inhibición de crecimiento)
- 1 = ligeramente turbio**, escaso crecimiento (75% inhibición de crecimiento)
- 2 = disminución prominente de la turbidez**, crecimiento moderado (50% inhibición de crecimiento)
- 3 = ligera reducción de la turbidez**, crecimiento abundante (25% inhibición de crecimiento)

4 = no hay reducción de la turbidez, crecimiento similar al pocillo de control de crecimiento (0% inhibición de crecimiento)

En el caso de levaduras, el MIC se define como la concentración más baja en la que se observa una puntuación de 2 (disminución prominente de la turbidez, crecimiento moderado).

Para los filamentos, el MIC se entiende como la concentración más baja que produce la inhibición total del crecimiento fúngico (100%).

El manual de referencia nos indica que los puntos de corte aún no han sido establecidos para su evaluación. Algunos aislamientos se agruparon como susceptibles ($MIC \leq 1\mu\text{g/mL}$), intermedios ($MIC = 2\mu\text{g/mL}$), y resistentes ($MIC \geq 4\mu\text{g/mL}$).

V. RESULTADOS

Los resultados son considerados válidos cuando el MIC de las cepas control se encuentran dentro de los rangos establecidos por el manual de referencia.

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para las cepas control: *Candida krusei* ATCC® 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 se encuentran en conformidad a lo establecido por el manual de referencia CLSI M27-A2³⁰ y M38-A2³¹.

Los puntos de corte considerados para las cepas de estudio y/o control fueron los que se establecieron en el año 2013.

La evaluación de la susceptibilidad antifúngica de Voriconazol en levaduras mencionadas en la *Tabla 4* muestra que las lecturas determinadas a las 24 y 48 horas son similares, no se observa una variación significativa entre los resultados de inhibición del crecimiento determinado a las 24 o 48 horas. En el caso de *Candida krusei* ATCC® 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango establecido por los manuales de referencia. En el caso de *Candida albicans* ATCC® 90028 es susceptible a voriconazol.

Tabla 4: EVALUACIÓN DEL MIC EN LEVADURAS A LAS 24 Y 48 HORAS

	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Referencia CLSI	0.06 - 0.5 µg/mL	0.016 - 0.12 µg/mL	[Susceptible ≤ 1 µg/mL]
MIC 24 horas	0.089-0.1276	0.0312	0.0312
Referencia CLSI	0.25 - 1.0 µg/mL	0.03 - 0.25 µg/mL	[Susceptible ≤ 1 µg/mL]
MIC 48 horas	0.1599-0.246	0.0312	0.0312

Al aplicar el análisis de varianza estadístico F (Fisher) a los resultados obtenidos en las especies de *Candidas* frente al antifúngico a las 24 horas (*Tabla 5*), observamos que la varianza es mínima entre cada especie de hongo evaluado.

Tabla 5: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MIC EN LEVADURAS FRENTE AL ANTIFUNGICO A LAS 24 HORAS

Grupos	N° de evaluación	Promedio	Varianza
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	10	0.1125	0.0006
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	10	0.0312	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	10	0.0276	0.0001

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	91.953	8,87501 E-13	3.35413083

De igual manera, en la *Tabla 6* se observan los resultados obtenidos en las especies de candidas frente al antifúngico a las 48 horas, se observa que la varianza es mínima entre cada especie de hongo evaluado.

Tabla 6: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MIC EN LEVADURAS FRENTE AL ANTIFUNGICO A LAS 48 HORAS

Grupos	N° de evaluación	Promedio	Varianza
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	10	0.2125	0.0036
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	10	0.0312	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	10	0.0312	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	90.1568	1,11926 E-12	3.3541

Lo que indica que las lecturas realizadas a las 24 horas no muestran variación a lo largo del tiempo, ya que al continuar el cultivo la respuesta obtenida a las 48 horas es similar a la inicialmente encontrada.

Por otro lado, al analizar los diversos MIC obtenidos en las cepas filamentosas frente a Voriconazol, encontramos que *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 es susceptible a Voriconazol, de acuerdo a la literatura Voriconazol presenta un alto potencial de inhibición frente a hongos filamentosos.²⁷ Sin embargo, nuestra investigación muestra que en el caso de *Fusarium solani* ATCC® 36031 es resistente a Voriconazol, con unos valores de MIC elevados, siendo resistente. (Tabla 7)

Por otro lado, en el caso de las levaduras (Cepas control de crecimiento) los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango, es decir son susceptibles a las 48 horas brindando un control de la placa aceptable.

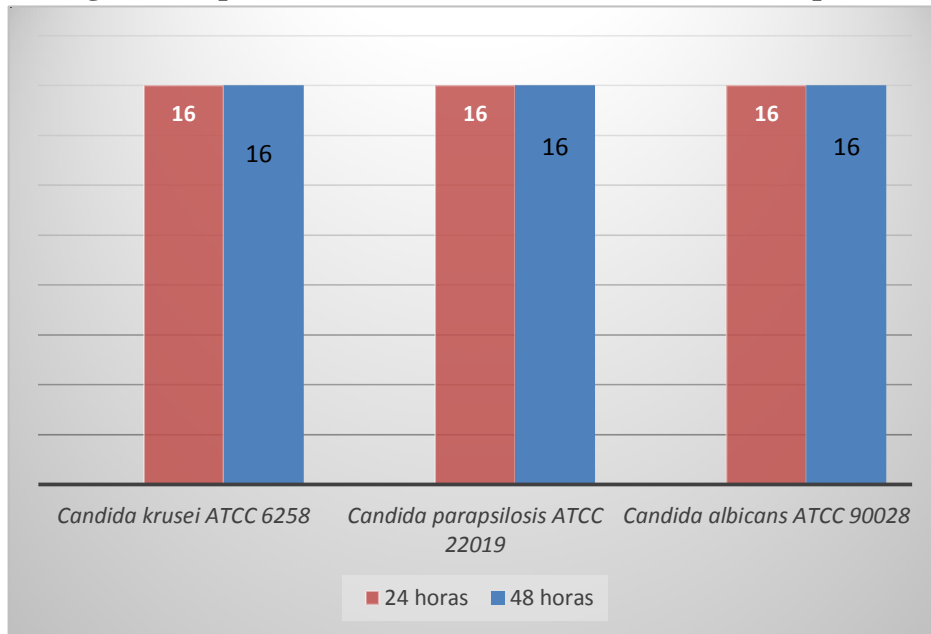
Tabla 7: EVALUACIÓN DEL MIC EN FILAMENTOS A LAS 48 HORAS

	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031
Referencia CLSI	0.12 - 1.0 µg/mL	0.03 - 0.25 µg/mL	[Susceptible ≤ 1 µg/mL]	[Resistente ≥ 4 µg/mL]
MIC 48 horas	0.25	0.0312	0.2118 – 0.3626	11.5160 – 16.3416

En el caso de la evaluación de la susceptibilidad de los hongos levaduriformes frente a ambos excipientes predominantes en la formulación, se observa que no tienen ningún efecto inhibitorio (0%), ya que el crecimiento es igual al pocillo control del crecimiento, no hay reducción de la turbidez. (Tabla 8)

Tabla 8: EVALUACION DEL MIC EN LEVADURAS FRENTE A LOS EXCIPIENTES A LAS 24 & 48 HORAS

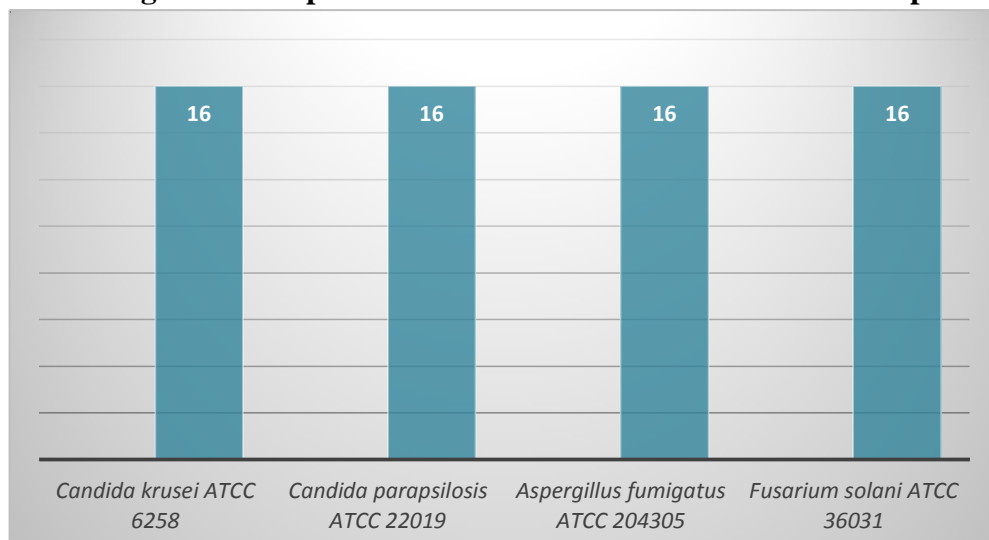
Fig. 10: Respuesta de cultivo de levaduras frente al excipiente



En el caso de los hongos filamentosos, los resultados muestran una característica similar a las obtenidas con los hongos levaduriformes. Es decir, encontramos 0% de inhibición en el crecimiento de los hongos filamentosos, *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 y *Fusarium solani* ATCC® 36031, de estudio frente a los dos excipientes analizados (predominantes en la formulación del gel). (Tabla 9)

Tabla 9: EVALUACION DEL MIC EN FILAMENTOS A LAS 48 HORAS

Fig. N° 11 Respuesta de cultivo de filamentos frente al excipiente



VI. DISCUSION

Queratitis es un proceso inflamatorio de la córnea y los tejidos que recubren la pupila e iris, se caracteriza por un proceso inflamatorio, ulceración y necrosis del estroma. La elección efectiva del agente antifúngico frente al agente etiológico (crecimiento de hongos) sigue siendo un desafío.²⁰ El CLSI ha establecido los puntos de corte para evaluar la susceptibilidad antifúngica de algunas cándidas y filamentos frente a voriconazol y otros agentes antifúngicos.^{30, 31}

En nuestro estudio, evaluamos la actividad in vitro de voriconazol frente a tres especies de hongos *Candida albicans* ATCC[®] 90028, *Aspergillus fumigatus* ATCC[®] 204305 y *Fusarium solani* ATCC[®] 36031, comparando la variabilidad de respuesta a 24 h y 48 h de incubación.

Este estudio demostró que los puntos finales de CIM para voriconazol son comparables o menores que el establecido para el agente patógeno levaduras con un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* ATCC[®] 90028 tanto a 24 como a 48 horas de 0.0312 µg/mL en promedio, no encontrándose diferencias significativas en cuanto a inhibición cuando se reporta a 48 horas.

Resultado similar se observó cuando se evaluó la inhibición del crecimiento obtenido en la cepa filamentosa, *Aspergillus fumigatus* ATCC[®] 204305, y voriconazol, con una media de inhibición de 0.2118 – 0.3626 µg/mL a 48 h de incubación.²⁶

Por otro lado, se observa que voriconazol no presenta buena actividad contra *Fusarium solani* ATCC[®] 36031, ya que el promedio de resultados obtenidos tiene una CIM de 11.5160 – 16.3416 µg/mL, de acuerdo con la interpretación del manual CLSI M38-A2 la muestra es resistente a voriconazol. En vista a los resultados obtenidos *Fusarium solani* ATCC[®] 36031, cepa aislada de un paciente con úlcera corneal del Estado de Anambra, Nigeria, no es susceptible a

voriconazol. Se consideró como punto final de crecimiento la concentración más baja de voriconazol que impide el crecimiento del 100% (100% inhibición).³⁵ Desafortunadamente, la falta de aislados bien caracterizados de pacientes infectados con queratitis fúngica por *Fusarium solani spp* impidió evaluar el potencial inhibitorio del gel oftálmico de voriconazol.

En cuanto a los excipientes predominantes en la formulación del gel oftálmico de voriconazol, ácido poliacrílico e hidroxipropil-beta-ciclodextrina, se demuestra que no tienen ningún efecto inhibitorio (0%) cuando se enfrenta a las tres cepas de estudio, no hay reducción de la turbidez. (*Tabla 8 y 9*). Por lo que la formulación no ejerce ningún efecto significativo en el poder inhibitorio de voriconazol frente a hongos levaduriformes y filamentosos.

VII. CONCLUSIONES

- ✓ *Candida albicans* ATCC® 90028 es susceptible al gel oftálmico de Voriconazol, por lo que puede ser utilizado como tratamiento en queratitis fúngica producida por este hongo.

- ✓ *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 es susceptible al gel oftálmico de Voriconazol, por lo que puede ser utilizado como tratamiento en queratitis fúngica producida por este hongo.

- ✓ *Fusarium solani* ATCC® 36031 es resistente al gel oftálmico de Voriconazol, por lo que no es recomendable su utilización como tratamiento en queratitis fúngica, debido a que no inhibe su crecimiento.

VIII. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar otras especies de *Fusarium spp.* para determinar si la baja inhibición obtenida con Voriconazol también ocurre con otras especies de *Fusarium spp.*
- ✓ Ensayar otro agente antifúngico triazólico de segunda generación con las especies de *Fusarium spp.*, para poder determinar si es resistente o susceptible.
- ✓ Evaluar el gel oftálmico de Voriconazol en pacientes clínicos infectados con *Fusarium solani*, con el fin de observar el perfil de inhibición (cepas susceptibles o resistentes).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anaissie, Elias. McGinnis, Michael R., Pfaller, Michael. et al. *Clinical Mycology*. Second edition. Elsevier. Pág. 627-628
2. ARRUA, M, LASPINA, F, SAMUDIO, M *et al.* **Queratitis infecciosas. Características clínicas y microbiológicas. Período 2003-2006.** *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, jun. 2008, vol.6, no.1, p.05-14. ISSN 1812-9528.
3. NICOLA, Federico. **Queratitis infecciosa no viral: factores predisponentes, agentes etiológicos y diagnóstico de laboratorio.** *Rev. argent. microbiol.* [online]. 2005, vol.37, n.4 [citado 2013-02-27], pp. 229-239]
4. Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis: Changing pathogens and risk factors. *Cornea JRNL*. 2009, vol.28, n.6, pp. 638-643
5. **Cornea.** *Cornea 2011: Controversies and Consensus.* American Academy of Ophthalmology.
6. Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. **Epidemiological profile of fungal keratitis in urban population of West Bengal, India.** *Oman J Ophthalmol* 2009;2: 114-8
7. Srinivasan M. **Fungal keratitis.** *Current Opinion in Ophthalmology*: Aug. 2004, vol.15, no.4, p.321-327
8. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, Meenakshi R, Palaniappan R. **Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-years study.** *Indian J Ophthalmol* 2003; 51:315-21
9. Epstein A. **In the aftermath of the Fusarium keratitis outbreak: What have we learned.** *Clinical Ophthalmology*. 2007. December; 1(4): 355-366

10. Muniz A, Vieira L, Höfling-Lima A, Zorat M, Fischman O, De Freitas D, Barbosa L. *Laboratorial analyses of fungal keratitis in a University Service*. ARQ. BRAS. OFTAL. 63(1), FEVEREIRO/200.
11. Tanure M, Cohen E, Sudesh S, Raquano C, Laibson P. *Spectrum of Fungal Keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania*. Cornea 19(3): 307-312, 200
12. Cuero R. *Ecological distribution of Fusarium solani and its opportunistic action related to mycosis keratitis in Cali, Colombia*. Clin. Microbiol. 1980 September; 12(3): 455-461
13. Saha R, Das S. *Mycological profile of infectious Keratitis from Delhi*. Indian J Med Res 123, February 2006, pp 159-164.
14. Thomas PA. *Fungal infections of the cornea*. Eye (Lond). 2003; 17: 852–862.
15. Leck A, Thomas P, Hagan M, Kalamurthy J, Ackuaku E, John M, Newman M, Codjoe F, Opintan J, Kalavathy C, Essuman V, Jesudasan C, Johnson G. **Etiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis**. Br J Ophthalmol 2002; 86:1211–1215
16. Ibrahim MM, de Angelis R, Lima AS, Viana de Carvalho GD, Ibrahim FM, et al. (2012) *A New Method to Predict the Epidemiology of Fungal Keratitis by Monitoring the Sales Distribution of Antifungal Eye Drops in Brazil*.
17. Tuft SJ, Tullo AB. *Fungal keratitis in the United Kingdom 2003– 2005*. Eye. 2009; 23:1308–1313.
18. He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, Yokoyama K, Wang L. *Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of Fusarium solani*. IOVS, April 2011, 52: 2804-2808

19. **Información recibida directamente del autor.** Dr. Msc. Biólogo – Microbiólogo – Parasitólogo - Carlos Armando Ayllón Arce. Servicio de Laboratorio de Microbiología Ocular – Instituto Nacional de Oftalmología. 2011-2012 - Lima - Perú
20. Hariprasad S, Mieler W, Lin T, Sponsel W, Graybill J. *Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature.* Br J Ophthalmol 2008; 92:871-878. doi:10.1136/bjo.2007.136515
21. Lee S J, Lee J J, Kim S D, et al. Topical and oral Voriconazole in the Treatment of Fungal Keratitis. Korean J Ophthalmol. 2009 March; 23(1):46-48.
22. Hariprasad S, Mieler W, Lin T, Sponsel W, Graybill J. *Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature.* Br J Ophthalmol 2008; 92:871-878. doi:10.1136/bjo.2007.136515
23. Klont R, Eggink C, Riijs A, Wesseling P, Verweij P, et at. *Successful Treatment of Fusarium Keratitis with Cornea Transplantation and Topical and Systemic Voriconazole.*
24. Lalitha P, Shapiro B, Srinivasan M, et al. *Antimicrobial Susceptibility of Fusarium, Aspergillus, and other Filamentous Fungi Isolate from Keratitis.* Arch Ophthalmol.2007; 125: 789-793
25. Nulens E et al. *Keratitis Caused by Scedosporium apiospermum Successfully Treated with a Cornea Transplant a Voriconazole.* JCM, 41(5): 2261-2264. 2003.
26. McGinnis M R, Pasarell L, Sutton D A, Fothergill A W, Cooper C R, Rinaldy M G. *In vitro evaluation of Voriconazole against some clinically important fungi.* Antimicrobial Agents Chemotherapy, 41(8): 1832-1834. 1997

27. Gao H, Pennesi M, Shah K, Qiao X, et al. *Safety of intravitreal voriconazole: electroretinographic and histopathologic studies*. Trans. Am. Ophthalmol Soc. 2003; 101:183-190
28. Vemulakonda G A, Hariprasad S M, Mieler W F, et al. *Aqueous and vitreous concentration following topical administration of 1% voriconazole in humans*. Arch Ophthalmol 2008; 126(1): 18-22.
29. Tortora, Gerald J., Funke, Berdell R., Case, Christine L. *Introducción a la microbiología*. Editorial Panamericana. 2007. Novena Edición. Pág. 346 – 350.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard – Second edition*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
31. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
32. Mandell, Geral, Dolin, Raphael y Bennett, John. *Enfermedades infecciosas Principios y prácticas*. Editorial Elsevier. Volumen 2. Pág. 1395 – 1404
33. P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J.C. Leza, M.A. Moro, A. Portolés. **Velázquez Farmacología Básica y Clínica**. 18ª. Edición. Editorial Panamericana. 2008. Madrid. Páginas 957-968.
34. Farmacopea de Estados Unidos (USP 39), edición vigente. Capítulos generales <1151> Formas farmacéuticas – geles.
35. Radford Sarah, Johnson Elizabeth, Warnock David. *In vitro studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against*

emerging and less-common mold pathogens. American Society of Microbiology. April 1997, p. 841–843

FIGURAS

FIGURA 1

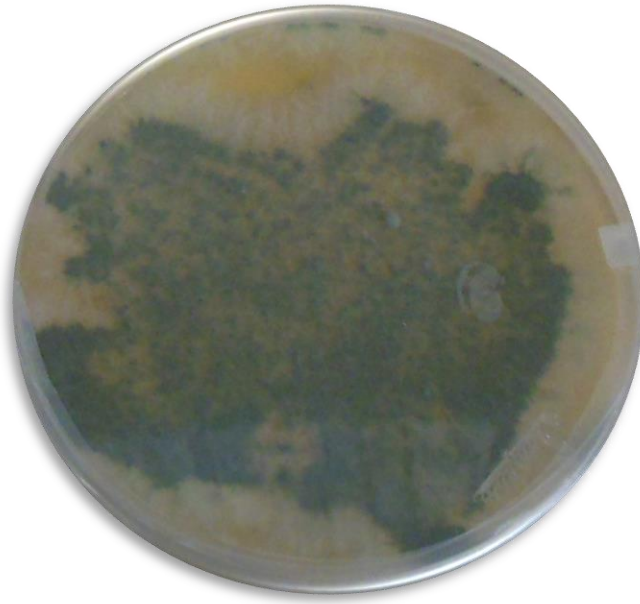


a	Monofialide con microconidias en masa
b	Microconidias



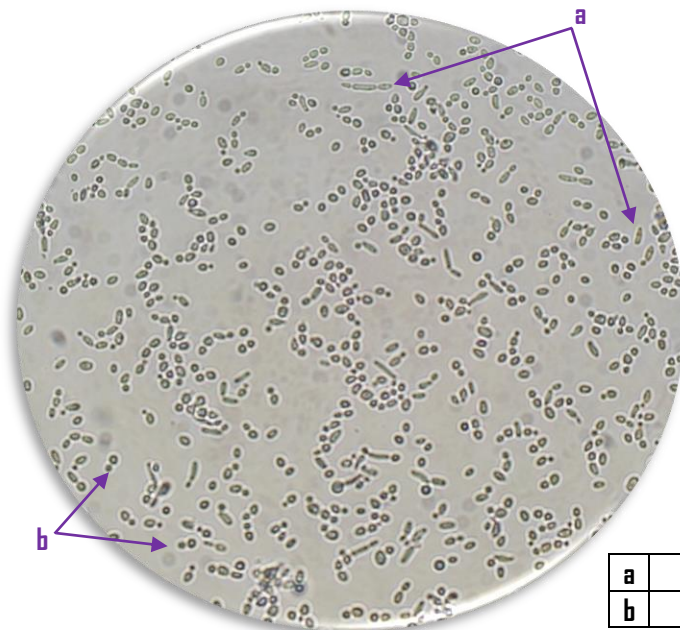
Fusarium solani ATCC® 36031

FIGURA 2



Aspergillus fumigatus ATCC® 204305

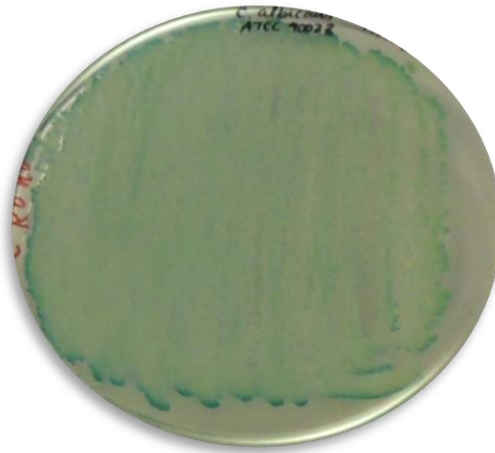
FIGURA 3



a	Seudohifas
b	Levaduras

Candida albicans ATCC® 90028

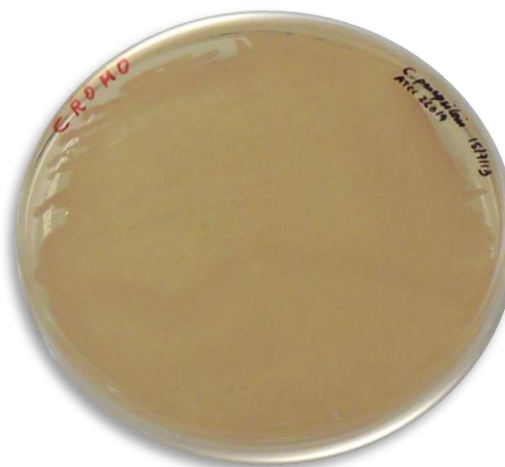
FIGURA 4



Candida albicans ATCC® 90028



Candida krusei ATCC® 6258



Candida parapsilosis ATCC® 22019

Crecimiento de levaduras en CHROMagar™ Candida

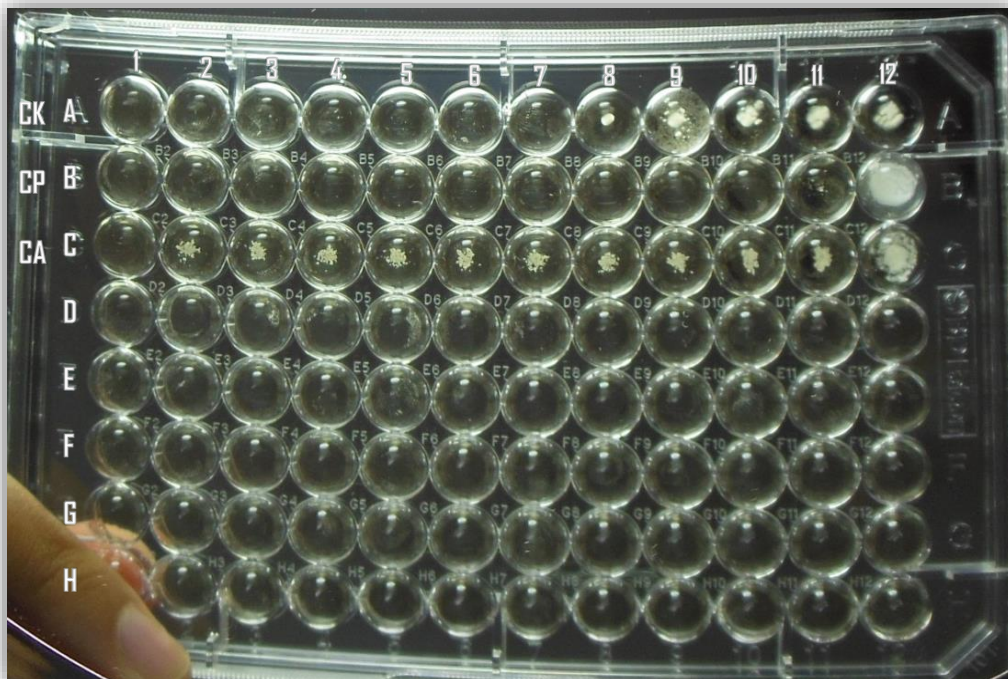
FIGURA 5



Lectura de placas con antifúngico a las 24 horas de incubación – Levaduras

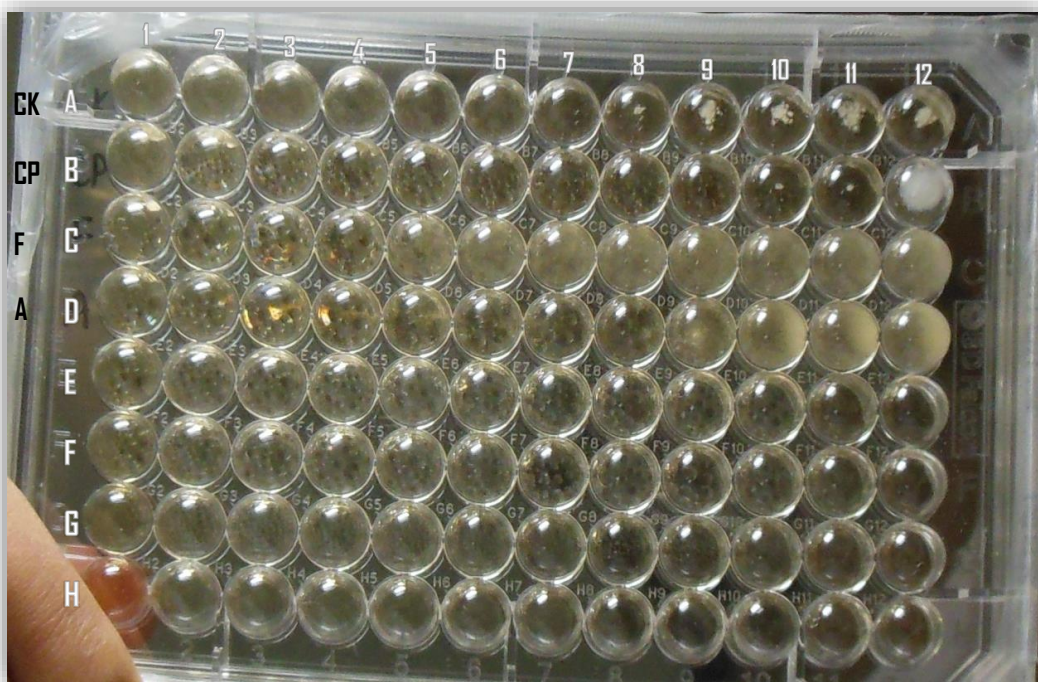
CK	<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258
CP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019
CA	<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028

FIGURA 6



Lectura de placas con antifúngico a las 48 horas de incubación – Levaduras

FIGURA 7



Lectura de placas con antifúngico a las 48 horas de incubación – Filamentos

CK	<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258
CP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019
F	<i>Fusarium solani</i> ATCC® 36031
A	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305

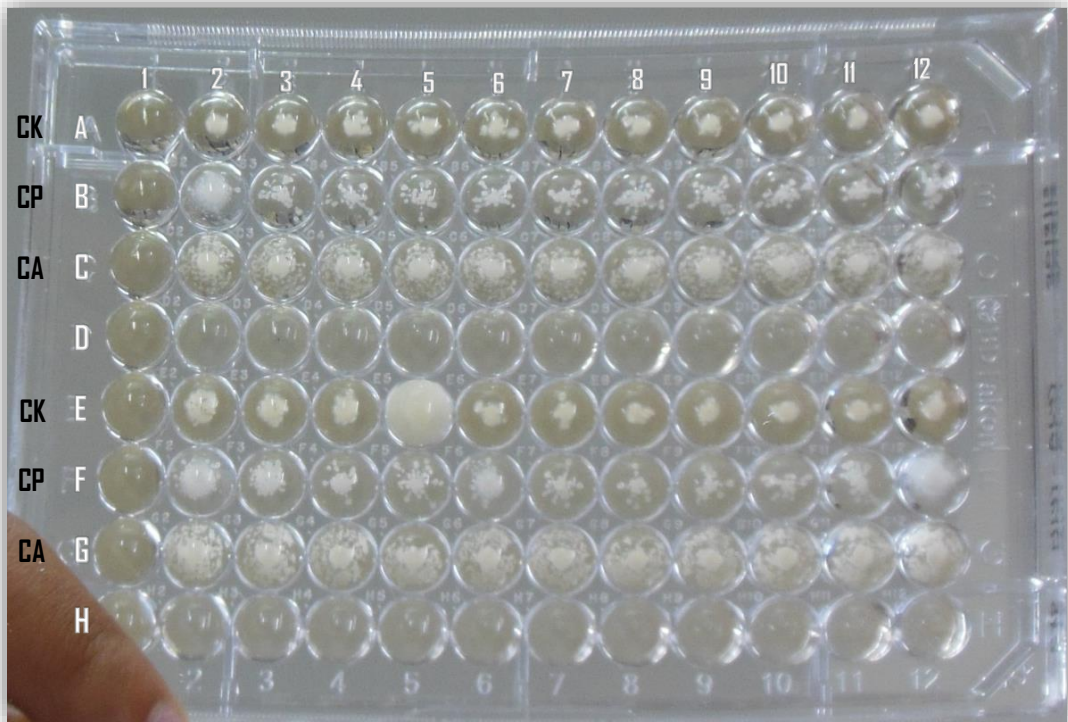
FIGURA 8



Lectura de placas con excipientes a las 24 horas de incubación – Levaduras

CK	<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258
CP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019
CA	<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028

FIGURA 9



Lectura de placas con excipientes a las 48 horas de incubación – Levaduras



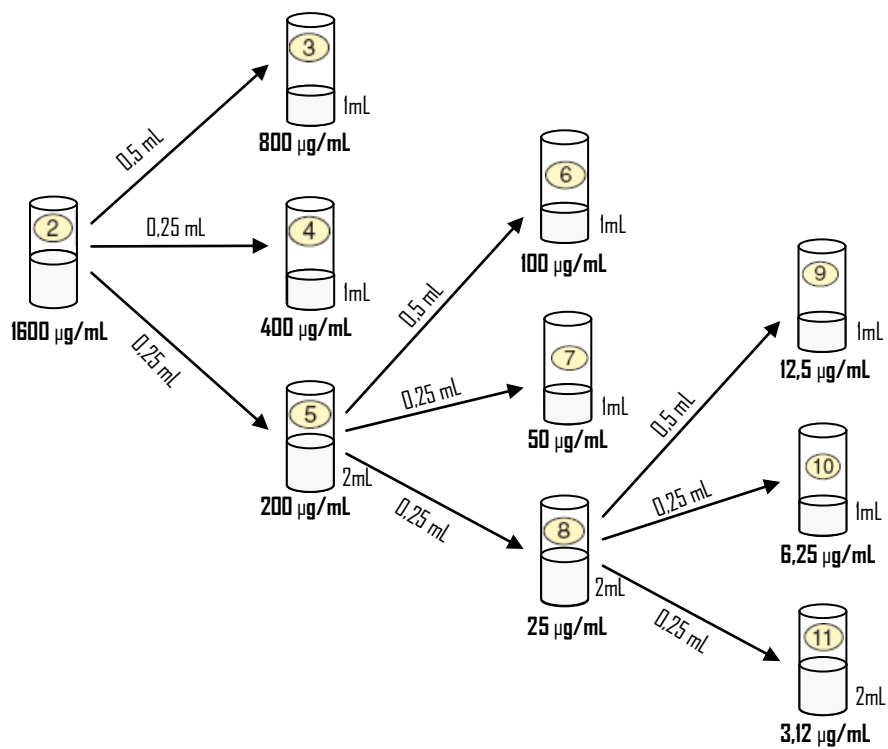
Lectura de placas con excipientes a las 48 horas de incubación – Filamentos

CK	<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258
CP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019
F	<i>Fusarium solani</i> ATCC® 36031
A	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305

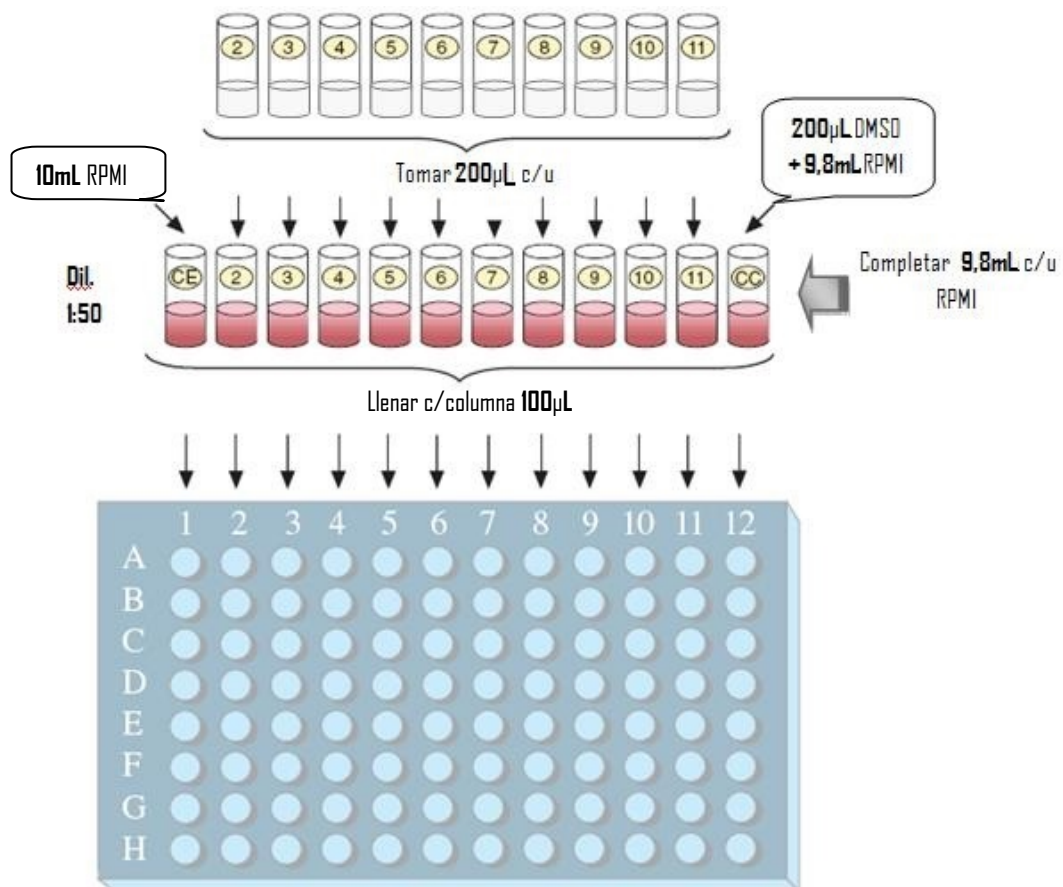
ANEXO 1

Disoluciones seriadas

Llenado de placas



Esquema 1: Preparación de una serie de diluciones de antifúngicos insolubles en agua para ser utilizado en la prueba de sensibilidad en caldo. *Dimetil sulfóxido (DMSO)



Esquema 2: Segundo paso de la preparación de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

ANEXO 2

Lectura de placas con Voriconazol– Levaduras

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 001

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)			
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia
2	Disminución prominente de la turbidez	3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez		

Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)	
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test[®])

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC [®] 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 18/07/2013

Tº 35.5

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CA	A		1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	4	0.0312
CK	B		0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	0.125
CP	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 19/07/2013

Tº 35.7

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CA	A		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	4	0.0312
CK	B		0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	4	0.125
CP	C		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC[®] 6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019

CA: *Candida albicans* ATCC[®] 90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 002

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)			
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia
2	Disminución prominente de la turbidez	3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez		

Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)	
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test[®])

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC [®] 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 18/07/2013

T^º 35.5 °C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CA	A		0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	4	0.0312
CK	B		0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	0.0625
CP	C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 19/07/2013

T^º 35.7 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CA	A		1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	0.0312
CK	B		0	0	0	0	0	0	2	3	3	4	4	0.25
CP	C		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: **CK:** *Candida krusei* ATCC[®] 6258, **CP:** *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019

CA: *Candida albicans* ATCC[®] 90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 003

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 24/07/2013

Tª 35.2°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	0.0625
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 25/07/2013

Tª 34.9 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC® 6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC® 22019

CA: *Candida albicans* ATCC® 90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 004

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 24/07/2013

Tª 35.2°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 25/07/2013

Tª 34.9 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	0.0625
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC® 6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC® 22019

CA: *Candida albicans* ATCC® 90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 005

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 26/07/2013

Tª 35°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	0,125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	4	0,0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 27/07/2013

Tª 35.4 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	0,25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0,0312
CA	C		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	0,0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 006

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)			
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia
2	Disminución prominente de la turbidez	3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez		

Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)	
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 26/07/2013

Tª 35°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 27/07/2013

Tª 35.4 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	0.25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0.0312
CA	C		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 007

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 31/07/2013

Tª 35.5°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 01/08/2013

Tª 35.6°C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	0.25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 008

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 31/07/2013

Tª 35.5°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 01/08/2013

Tª 35.6 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	0.25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 009

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible µg/mL	Susceptible dosis dependiente (SDD) µg/mL	Resistente µg/mL
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC (µg/mL) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 01/08/2013

Tª 35.5°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	1	4	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 02/08/2013

Tª 35.5 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	3	3	4	4	0.25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

VORICONAZOL: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 010

Consideraciones generales:

Puntuación numérica para la cuantificación del crecimiento (CLSI M27-A2)				
0	Ópticamente claro	1	Ligeramente turbia	
2	Disminución prominente de la turbidez		3	Ligera reducción de la turbidez
4	No hay reducción de la turbidez			
Definición del MIC mediante puntuación (CLSI M27-A2)				
Anfotericina B	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de cero (0 = ópticamente claro).			
5-FC y azoles	Concentración más baja en la que se observa una puntuación de dos (2 = disminución prominente de la turbidez).			

Tabla 1. Puntos de corte para fármacos antifúngicos de *Candida* spp según criterios CLSI M27-S3 y EAS 006 (E test®)

Antifúngico	Susceptible $\mu\text{g/mL}$	Susceptible dosis dependiente (SDD) $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	≤ 1	-	> 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

MIC ($\mu\text{g/mL}$) ranges for microdilution tests							
Organism	Antifungal Agent	Range	24-h Mode	% within Range	Range	48-h Mode	% within Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97	0.5-4.0	2.0	92
	5FC	0.06-0.25	0.12	99	0.12-0.5	0.25	98
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98	1.0-4.0	2.0	99
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	96	0.12-0.5	0.25	98
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	98	0.06-0.5	0.12	98
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100	0.03-0.25	0.06	100
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	96	0.03-0.25	0.06	98
Posaconazole	0.06-0.25	0.12	97	0.06-0.25	0.12	99	
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100	1.0-4.0	2.0	100
	5FC	4.0-16	8.0	98	8.0-32	16	99
	Fluconazole	8.0-64	16	100	16-128	32	100
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	100
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	96	0.25-1.0	0.5	99
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98	0.25-1.0	0.5	100
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93	0.25-2.0	0.5	100
Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100	0.12-1.0	0.5	99	

Tiempo de lectura: 24 h

Fecha: 01/08/2013

Tª 35.5°C

Referencia: CLSI M27-A2

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0.125
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 02/08/2013

Tª 35.5 °C

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC	Resultados
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	0.25
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0.0312
CA	C		1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	0.0312
	D													
	E													
	F													
	G													
	H													

NOTAS: Tener en cuenta que: CK: *Candida krusei* ATCC®6258, CP: *Candida parapsilosis* ATCC®22019

CA: *Candida albicans* ATCC®90028

ANEXO 3

Lectura de placas con Voriconazol – Filamentos

VORICONAZOL: Lectura de placas – Filamentos

Consideraciones generales:

Definición del MIC (CLSI M38-A2)	
Itraconazole Posaconazole Ravuconazole Voriconazole	Para estos azoles, los puntos finales suelen definirse fácilmente y el MIC se lee como la más baja concentración de droga que impide cualquier crecimiento apreciable (100% inhibición). Los puntos finales de estos agentes contra <i>Aspergillus</i> spp y otros hongos patógenos oportunistas generalmente no se encuentran.

Interpretación de resultados: Puntos de corte	
MIC or MEC ≤ 1µg/mL	Susceptible
MIC or MEC = 2µg/mL	Intermedio
MIC or MEC ≥ 4µg/mL	Resistente

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours
		<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0
5FC	8.0-32			16	99.6	48 hours
Fluconazole	16-128			32	100.0	48 hours
Itraconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ketoconazole	0.25-1.0			0.5	99.6	48 hours
Voriconazole	0.12-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ravuconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Posaconazole	0.12-1.0			0.5	99.6	48 hours
Anidulafungin	0.03-0.12			0.06	97.5	48 hours
Caspofungin	0.25-1.0			0.5	97.5	48 hours
Micafungin	0.12-0.5			0.25	99.0	48 hours

Referencia: CLSI M38-A2

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 28/09/2013

Tº 35.3 °C

Code Nº: 015

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
F	C		0	0	3	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
8
0.25

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 28/09/2013

Tº 35.3 °C

Code Nº: 016

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
F	C		0	0	1	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
8
0.50

NOTAS: Tener en cuenta que: **CK:** *Candida krusei* ATCC® 6258, **CP:** *Candida parapsilosis* ATCC® 22019

CA: *Candida albicans* ATCC® 90028, **F:** *Fusarium solani* ATCC® 36031, **A:** *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305

VORICONAZOL: Lectura de placas – Filamentos

Consideraciones generales:

Definición del MIC (CLSI M38-A2)	
Itraconazole Posaconazole Ravuconazole Voriconazole	Para estos azoles, los puntos finales suelen definirse fácilmente y el MIC se lee como la más baja concentración de droga que impide cualquier crecimiento apreciable (100% inhibición). Los puntos finales de estos agentes contra <i>Aspergillus</i> spp y otros hongos patógenos oportunistas generalmente no se encuentran.

Interpretación de resultados: Puntos de corte	
MIC or MEC ≤ 1µg/mL	Susceptible
MIC or MEC = 2µg/mL	Intermedio
MIC or MEC ≥ 4µg/mL	Resistente

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours
		<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0
5FC	8.0-32			16	99.6	48 hours
Fluconazole	16-128			32	100.0	48 hours
Itraconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ketoconazole	0.25-1.0			0.5	99.6	48 hours
Voriconazole	0.12-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ravuconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Posaconazole	0.12-1.0			0.5	99.6	48 hours
Anidulafungin	0.03-0.12			0.06	97.5	48 hours
Caspofungin	0.25-1.0			0.5	97.5	48 hours
Micafungin	0.12-0.5			0.25	99.0	48 hours

Referencia: CLSI M38-A2

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 03/10/2013

Tº 35.2ºC

Code Nº: 017

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
F	C		0	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 03/10/2013

Tº 35.2ºC

Code Nº: 018

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
F	C		0	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25

NOTAS: Tener en cuenta que: **CK:** *Candida krusei* ATCC® 6258, **CP:** *Candida parapsilosis* ATCC® 22019

CA: *Candida albicans* ATCC® 90028, **F:** *Fusarium solani* ATCC® 36031, **A:** *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305

VORICONAZOL: Lectura de placas – Filamentos

Consideraciones generales:

Definición del MIC (CLSI M38-A2)	
Itraconazole Posaconazole Ravuconazole Voriconazole	Para estos azoles, los puntos finales suelen definirse fácilmente y el MIC se lee como la más baja concentración de droga que impide cualquier crecimiento apreciable (100% inhibición). Los puntos finales de estos agentes contra <i>Aspergillus</i> spp y otros hongos patógenos oportunistas generalmente no se encuentran.

Interpretación de resultados: Puntos de corte	
MIC or MEC ≤ 1µg/mL	Susceptible
MIC or MEC = 2µg/mL	Intermedio
MIC or MEC ≥ 4µg/mL	Resistente

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours
		<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0
5FC	8.0-32			16	99.6	48 hours
Fluconazole	16-128			32	100.0	48 hours
Itraconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ketoconazole	0.25-1.0			0.5	99.6	48 hours
Voriconazole	0.12-1.0			0.5	100.0	48 hours
Ravuconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours
Posaconazole	0.12-1.0			0.5	99.6	48 hours
Anidulafungin	0.03-0.12			0.06	97.5	48 hours
Caspofungin	0.25-1.0			0.5	97.5	48 hours
Micafungin	0.12-0.5			0.25	99.0	48 hours

Referencia: CLSI M38-A2

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 04/10/2013

Tº 35.1 °C

Code Nº: 019

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
F	C		0	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	1	2	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.50

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 04/10/2013

Tº 35.1 °C

Code Nº: 020

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	1	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
F	C		0	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
	E												
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25

NOTAS: Tener en cuenta que: **CK:** *Candida krusei* ATCC® 6258, **CP:** *Candida parapsilosis* ATCC® 22019

CA: *Candida albicans* ATCC® 90028, **F:** *Fusarium solani* ATCC® 36031, **A:** *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305

VORICONAZOL: Lectura de placas – Filamentos

Consideraciones generales:

Definición del MIC (CLSI M38-A2)	
Itraconazole Posaconazole Ravuconazole Voriconazole	Para estos azoles, los puntos finales suelen definirse fácilmente y el MIC se lee como la más baja concentración de droga que impide cualquier crecimiento apreciable (100% inhibición). Los puntos finales de estos agentes contra <i>Aspergillus</i> spp y otros hongos patógenos oportunistas generalmente no se encuentran.

Interpretación de resultados: Puntos de corte	
MIC or MEC \leq 1 μ g/mL	Susceptible
MIC or MEC = 2 μ g/mL	Intermedio
MIC or MEC \geq 4 μ g/mL	Resistente

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (μ g/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours		
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours		
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours		
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours		
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours		
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours		
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours		
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours		
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours		
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours		
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours		
		<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0	100.0	48 hours
				5FC	8.0-32	16	99.6	48 hours
Fluconazole	16-128			32	100.0	48 hours		
Itraconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours		
Ketoconazole	0.25-1.0			0.5	99.6	48 hours		
Voriconazole	0.12-1.0			0.5	100.0	48 hours		
Ravuconazole	0.25-1.0			0.5	100.0	48 hours		
Posaconazole	0.12-1.0			0.5	99.6	48 hours		
Anidulafungin	0.03-0.12			0.06	97.5	48 hours		
Caspofungin	0.25-1.0			0.5	97.5	48 hours		
Micafungin	0.12-0.5			0.25	99.0	48 hours		

Referencia: CLSI M38-A2

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 11/10/2013

Tº 35.1 ºC

Code Nº: 021

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	4
F	C		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
	E												
F	F		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	G		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25
16
0.25

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 11/10/2013

Tº 35.1 ºC

Code Nº: 022

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4
F	C		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
	E												
F	F		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	G		0	0	0	0	0	0	1	0	3	4	4
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25
16
0.25

NOTAS: Se duplicó la inoculación de *Fusarium Solani* ATCC® 36031 y *Aspergillus fumigatus* ATCC® 204305 para verificar los resultados obtenidos.

VORICONAZOL: Lectura de placas – Filamentos

Consideraciones generales:

Definición del MIC (CLSI M38-A2)	
Itraconazole Posaconazole Ravuconazole Voriconazole	Para estos azoles, los puntos finales suelen definirse fácilmente y el MIC se lee como la más baja concentración de droga que impide cualquier crecimiento apreciable (100% inhibición). Los puntos finales de estos agentes contra <i>Aspergillus</i> spp y otros hongos patógenos oportunistas generalmente no se encuentran.

Interpretación de resultados: Puntos de corte	
MIC or MEC ≤ 1µg/mL	Susceptible
MIC or MEC = 2µg/mL	Intermedio
MIC or MEC ≥ 4µg/mL	Resistente

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0	100.0	48 hours
		5FC	8.0-32	16	99.6	48 hours
		Fluconazole	16-128	32	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ketoconazole	0.25-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Voriconazole	0.12-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.12-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.5	48 hours
		Caspofungin	0.25-1.0	0.5	97.5	48 hours
		Micafungin	0.12-0.5	0.25	99.0	48 hours

Referencia: CLSI M38-A2

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 12/10/2013

Tº 35.2 ºC

Code Nº: 023

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4
F	C		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
F	E		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 12/10/2013

Tº 35.2 ºC

Code Nº: 024

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4
CP	B		0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4
F	C		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
A	D		0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
F	E		0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
	F												
	G												
	H												

Resultados
0.25
0.0312
16
0.25
16

NOTAS: Se duplicó la inoculación de *Fusarium Solani* ATCC® 36031 para verificar los resultados obtenidos.

ANEXO 4

Lectura de placas con Excipientes – Levaduras y Filamentos

EXCIPIENTES: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 031

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 23/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 24/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Code Nº: 032

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 23/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 24/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

EXCIPIENTES: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 033

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 28/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 29/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Code Nº: 034

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 28/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 29/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

EXCIPIENTES: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 035

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 29/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 30/08/2013

Tº 35.4ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Code Nº: 036

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 29/08/2013

Tº 35.3ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 30/08/2013

Tº 35.4ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

EXCIPIENTES: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 037

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 30/08/2013

Tº 35.4ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 31/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Code Nº: 038

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 30/08/2013

Tº 35.4ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 31/08/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

EXCIPIENTES: Lectura de placas – Levaduras

Code Nº: 039

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 04/09/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 05/09/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Code Nº: 040

Tiempo de lectura: 24h

Fecha: 04/09/2013

Tº 35.5ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

Tiempo de lectura: 48h

Fecha: 04/09/2013

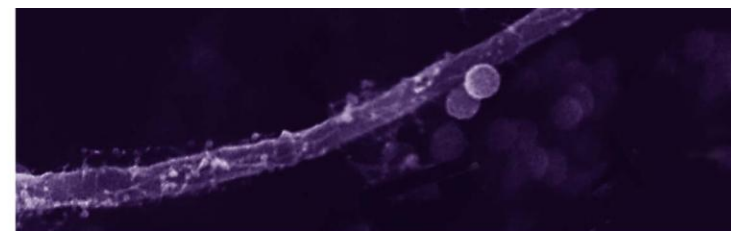
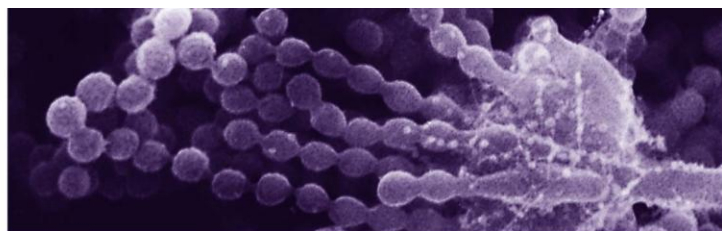
Tº 35.4ºC

CEPAS		CE	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	CC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CK	A		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	B		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	C		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	D												
CK	E		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CP	F		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CA	G		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	H												

Resultados
16
16
16
16
16
16

ANEXO 5

Información del producto: Cepas ATCC



Antifungal Susceptibility Testing Panel

ATCC Antifungal Susceptibility Testing Panel (ATCC® MP-5™) is comprised of 14 QC and reference strains used for broth dilution procedures described in the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) document *M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*, Approved Standard - Second Edition. This method is used for testing the susceptibility of invasive and cutaneous fungi to antifungal agents.

ATCC® No.	Organism	Designation	Geographic Isolation	Isolation Source	Purpose
6258™	<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC 749	Sri Lanka	Human sputum – patient with bronchomycosis	QC
22019™	<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 604	Puerto Rico (USA)	Case of Srpue	QC
204304™	<i>Aspergillus flavus</i>	MCV-C#1	Virginia (USA)	Human sputum	Reference
MYA-3626™	<i>Aspergillus fumigatus</i>	T33439	California (USA)	Unknown	Reference
MYA-3627™	<i>Aspergillus fumigatus</i>	FG 1432	Jacksonville, TN (USA)	Unknown	Reference
MYA-3629™	<i>Fusarium verticillioides</i>	H66173	Milwaukee, WI (USA)	Human patient	Reference
MYA-3630™	<i>Paecilomyces variotii</i>	10831220	Connecticut (USA)	Unknown	QC
MYA-3631™	<i>Aspergillus flavus</i>	AFL1	(USA)	Human biopsy	Reference
MYA-3633™	<i>Aspergillus terreus</i>	AT2	Unknown	Human	Reference
MYA-3634™	<i>Scedosporium apiospermum</i>	SC1	Unknown	Human heart	Reference
MYA-3635™	<i>Scedosporium apiospermum</i>	SC2	Unknown	Human	Reference
MYA-3636™	<i>Fusarium solani</i>	FS1	Unknown	Human	Reference
MYA-4438™	<i>Trichophyton rubrum</i>	MRL 666	(USA)	Human toenail	Reference
MYA-4439™	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	MRL 1957	(USA)	Human toenail	Reference


***Candida krusei* ATCC® 6258**




Product Sheet

Issatchenkia orientalis (ATCC® 6258™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Issatchenkia orientalis* (ATCC® 6258™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Strain Designation: [ATCC 749, CBS 573, CCRC 20514, IFO 1064, IFO 1395, JCM 1609, NRRL Y-413, NRRL Y-7179]

Deposited Name: *Candida krusei* (Castellani) Berkhout

Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth

ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar

ATCC® Medium 1245: YEPD

Growth Conditions

Temperature: 25°C to 30°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For **freeze-dried (lyophilized) ampoules:**

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed **for at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 1 to 2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Colony and Cell Morphology: After 4 days on Potato dextrose medium at 37°C, colony is white, smooth and soft. Cells are ovoid to cylindrical, single, in pairs or chains, pseudohyphae are absent.

Notes

Type strain for *Candida krusei*.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACG
AAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAAA
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAG
TGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCCCCCTCGGCATTCCGGGGGG
CATGCCTGTTTGAAGCTGCTTTCCATCTTGCCTGCGCAGAGTTGGGGAGCGGACGGACGCGTGTG
TAAAGAGCGTGGAGCTGCGACTCGCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTT
TCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTA
GGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAG
AGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCGAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGC
GGTGTCCAAGTCCCTTGGAAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGC
AGTGAGGCCCTTCTGACGAGTGTGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCATCTA
AGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAGCACTTTG




Product Sheet

Issatchenkia orientalis (ATCC® 6258™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

 Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Issatchenkia orientalis* (ATCC® 6258™)

AAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTG
CGCACCGCTGCTCTCGTGGGCGGCCTCTGGGCTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAG
AAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGA
GGACTGCGGCCGTAGGTACCGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGC



Isolation

Sputum of patient with bronchomycosis, Sri Lanka



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2016. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [03/01]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

***Candida parapsilosis* ATCC® 22019**




Product Sheet

Candida parapsilosis (ATCC® 22019™)

Please read this **FIRST**

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

 Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Strain Designation: CBS 604 [CCRC 20515, DBVPG 6150, DMS 5784, IBL 2545, IFO 1396, IGC 2545, JCM 1785, NCYC 601, NRRL Y-12969, UCD 61-27]

Deposited Name: *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice

Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth

ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar (PDA)

ATCC® Medium 325: Malt extract agar (Blakeslee's formula)

Growth Conditions

Temperature: 30°C to 35°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For **freeze-dried (lyophilized) ampoules:**

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed **for at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 1-2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Notes

Type strain of the species; used for assay of itraconazole, assay of ketoconazole, control strain for identification, degrades hydroxybenzoate, degrades phenol, produces (S)-1,3-butanediol dehydrogenase produces lipase, quality control, and susceptibility testing.

Quality control strain for bioMerieux VITEK 2 products.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATGAAAAGTGCTTAAGTGCATTTTTTCTTACACATGTGTTT
TTCTTTTTTGAACCTTTGCTTTGGTAGGCCCTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATTAAGTCAACCAAA
TTTTATTTAATGTCAACCGATTATTTAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCTCGG
GTTTGGTGTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAGAAAGCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTT
TTTCCACTCATTGGTACAACTCCAAACTTCTTCCAATTTCGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCT
GAACCTAAGCATATCAA

Isolation

Case of sprue, Puerto Rico


References




Product Sheet

Candida parapsilosis **(ATCC® 22019™)**

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™)

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/14]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor


***Candida albicans* ATCC® 90028**




Product Sheet

Candida albicans (ATCC® 90028™)

Please read this **FIRST**



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida albicans* (ATCC® 90028™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Strain Designation: NCCLS 11

Deposited Name: *Candida albicans* (Robin) Berkhout

Product Description: An ampoule containing viable cells suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth

ATCC® Medium 1245: YEPD

ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar

Growth Conditions

Temperature: 30°C to 35°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For **freeze-dry (lyophilized) ampoules:**

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed **for at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. Viability is typically noticeable after 1-2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Colony and Cell Morphology: After 2 days on YM agar at 30°C, colonies white, smooth, butyrous. Cells globose to ovoidal, single or in pairs, pseudohyphae not observed.

Notes

No special notes.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTCTTT
GAAACAAACTTGCTTTGGCGGTGGGCCAGCCTGCCGCCAGAGGTCTAAACTTACAACCAATTTTTTAT
CAACTTGTCACACCAGATTACTAATAAGTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGCGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGG
GTTTGGTGTTGAGCAATACGACTTGGGTTTGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGA
CAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAACATTGCTTGGCGCGGTAACGTCCACCACGATATCTTCAAACCTT
GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene


ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAA
AGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGG
CTCTTGCTATGTTCTTGGAAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCCGATGAGATGACCCGG
GTCTGTGTAAGTTCCCTCGACGAGTCCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTAAGTGGGTGGTAAATCCA
TCTAAAGCTAAATTTGGCGAGACCGGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAC
TTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTAT
TTTGATGCTGCTCTCGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGG
ATAATGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTTATAGCTCTGACGATACTGCCAGCCTAG




Product Sheet

***Candida albicans* (ATCC® 90028™)**

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida albicans* (ATCC® 90028™)

ACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGC



Isolation

Blood, Iowa



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/07]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

***Aspegillus fumigatus* ATCC® 204305**



Product Sheet

Aspergillus fumigatus (ATCC® 204305™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Aspergillus fumigatus* (ATCC® 204305™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Strain Designation: MCV-C#10

Deposited Name: *Aspergillus fumigatus* Fresenius

Product Description: An ampoule containing viable cells (yeast cells, spores, or agar cubes with mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar

ATCC® Medium 325: Malt extract agar (Blakeslee's formula)

ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar (PDA)

Growth Conditions

Temperature: 20°C to 25°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

Frozen ampoules packed in dry ice should either be thawed immediately or stored in liquid nitrogen. If liquid nitrogen storage facilities are not available, frozen ampoules may be stored at or below -70°C for approximately one week. **Do not under any circumstance store frozen ampoules at refrigerator freezer temperatures (generally -20°C).** Storage of frozen material at this temperature will result in the death of the culture.

1. To thaw a frozen ampoule, place in a **25°C to 30°C** water bath, until just thawed (**approximately 5 minutes**). Immerse the ampoule just sufficient to cover the frozen material. Do not agitate the ampoule.
2. Immediately after thawing, wipe down ampoule with 70% ethanol and aseptically transfer at least 50 µL (or 2-3 agar cubes) of the content onto a plate or broth with medium recommended.
3. Incubate the inoculum/strain at the temperature and conditions recommended.
4. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 2-3 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Notes

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACC
CGTGTCTATCGTACCTTGTGCTTCGCGGGCCCGCGTTCGACGGCCCGGGGAGGCCCTGCGCCC
CCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTA
TCGTAATCAGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCG
GTATTCCGGGGGCGATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCC
GTCCCCCTCTCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATG
GGGCTTTGTACCTGCTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene


ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAG
AGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGTCCCGTGTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCAGC
CCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCGTATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCTGC
GTCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTCA
TCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTATCGAAAGATGAAAAGCAC
TTTGGAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGGCAGCCAGACTCGCCCC
CGGGGTTTCAGCCGGCATTCTGCCCCGTACTTCCCGGTGGGGCCAGCGTCCGTTTGGCGGCCG
GTCAAAGGCCCTCGGAATGTATCACCTCTCGGGGTGCTTATAGCCGAGGGTGAATGCGGCCTGCCT
GGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCGTAATGGTCGTAATGAC




Product Sheet

Aspergillus fumigatus (ATCC® 204305™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Aspergillus fumigatus* (ATCC® 204305™)

Beta-tubulin (bTub)

```
CTCAAGAATGCAGCTTAGCTAAGCTGTTTTTTTTTATTCTACAGGTTACCTTCAGACCGGTGAGTGTGTA
AGTACTGCCGTGCCGTGGTGAAGAAGCATAGGGATGGTGTTCATTGAGCAGAAGCTAAACTTGATT
CTTGGTGACAGGGTAACCAAATTGGTGCCGCTTTCTGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGG
TGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGTTGAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAAC
AAATCTACAGGCAGACCATCTCTGGTGGATGGCCTTGACGGCTCGGCCAGTAAGTTCGACCTATAT
CCTCCCAATTGAGAAAGCGGCGGAAACACGAAAAACAAGGAAGAAGCGGACGCGTGTCTGATGGGA
AATAATAGCTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTATTTCACGAGGTGTGT
GGATGAAACTCTGATTTATACTATTTTCGGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTG
ACAAATATGTTCTCGTGCCGTTCTGGTCCGATCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCC
CTTCGGCGAGCTATTCCGTCGCCGACAACCTTCGCTTCGGCCAGTCCGGTGTGGTAACTG
```



Isolation

Human sputum, Virginia



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/28]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor


***Fusarium solani* ATCC® 36031**




Product Sheet

Fusarium solani (ATCC® 36031™)

Please read this **FIRST**



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Fusarium solani* (ATCC® 36031™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Strain Designation: FIV/74

Deposited Name: *Fusarium solani* (Martius) Saccardo

Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth

ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar (PDA)

Growth Conditions

Temperature: 24°C to 26°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For **freeze-dry (lyophilized) ampoules:**

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed **for at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 5 to 6 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Notes

This strain appeared to be a slow grower and less hardy than other *Fusarium* strains. Sporulation was also less and slower than other strains. To increase the recoverability from freeze-dried form, it is recommended to rehydrate in only 1 ml of water and transfer half of that to a agar plate rather than rehydrating in the full 5 ml.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
TTCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTTA
GCTACTACGCAATGGAAGCTGCGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTGTGCCCGCAGGG
GGCGCCTCGCCGATCCCCAACGCCAGGCCCGGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCAT
GCCCGCCAGAATACTGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTC
ACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT
AATTTATTTGCTGTTTTACTCAGAAGAAACATAATAGAAACAGAGTTAGGGGGTCTCTGGCGGGGG
CGGCCCGTGTACGGGGCCGTCTGTTCCCGCCGAAGCAACGTTTTAGGTATGTTACAGGGTTGATGAG
TTGTATACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCTCTA
AATGACCGAGTTTGAGAGCTTTCC

Isolation


Corneal ulcer in man, Anambra State, Nigeria




Product Sheet

Fusarium solani (ATCC®) 36031™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Fusarium solani* (ATCC® 36031™)

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [11/05]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor