

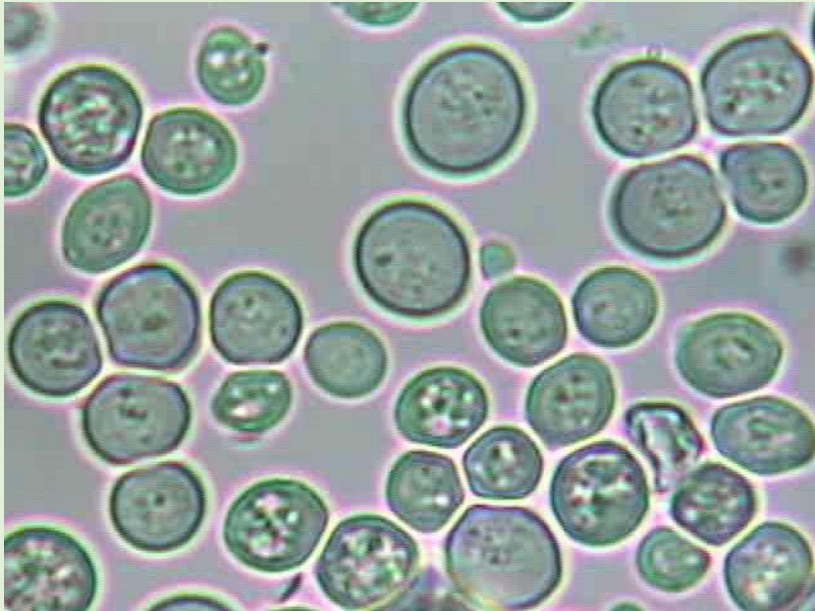
Investigación en antifúngicos

Maximiliano Sortino

Preparación de inóculos fúngicos

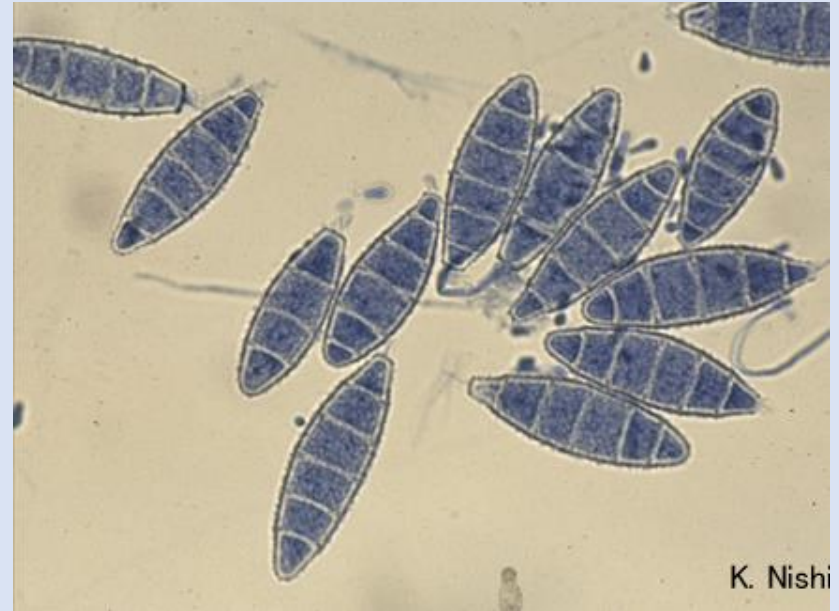
Inóculo fúngico

Hongos levaduriformes



Inóculo: suspensión de levaduras

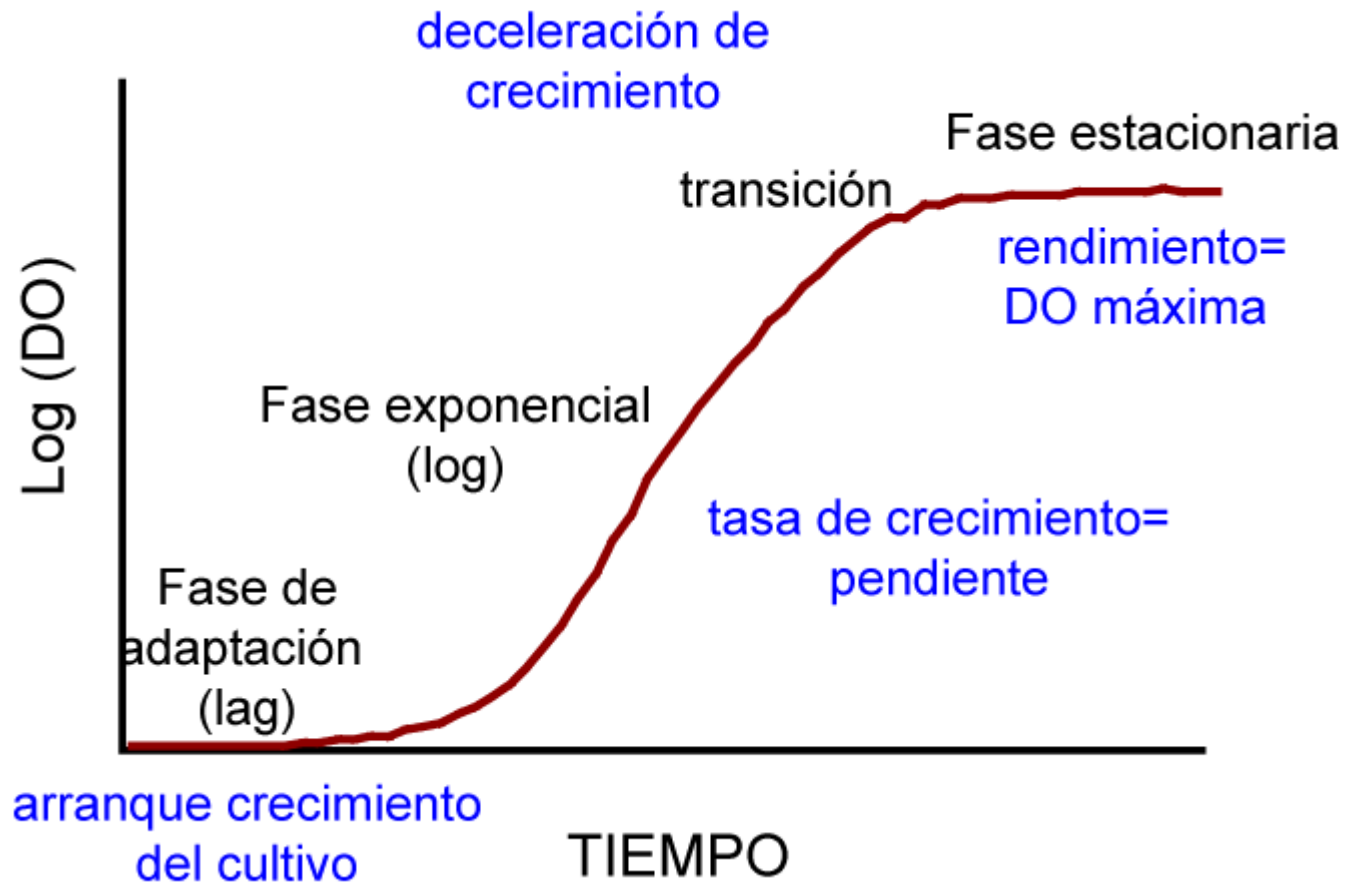
Hongos filamentosos



K. Nishi

Inóculo: suspensión de conidios o esporas

Preparación del inóculo: levaduras



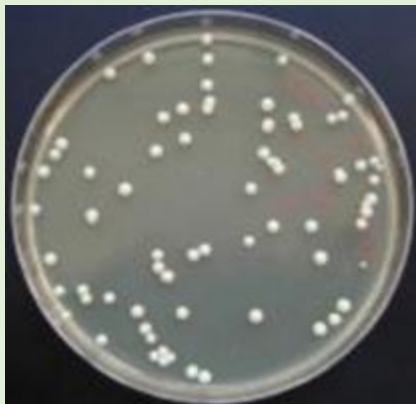
Preparación del inóculo: levaduras

Incubar a 35°C durante 24 h para *Candida* spp. y 48 h para *Cryptococcus neoformans*

Medio sólido (agar Sabouraud)

VENTAJAS

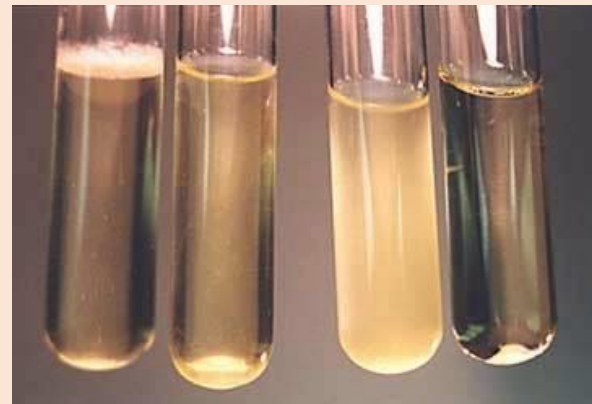
- Permite detectar contaminantes
- Recomendado en estándares



Medio líquido (caldo Sabouraud)

VENTAJAS

- Es más fácil hacer suspensiones homogéneas
- Se ven menos pseudomicelios



Preparación del inóculo de levaduras



Tocar 5 colonias de
 ≈ 1 mm de diámetro

suspender en 5 ml de
solución salina estéril
0,85% (0,145 mol/l de
NaCl)

Agitar la suspensión
durante 15 segundos

ajustar a $1-5 \times 10^6$
UFC/ml)

Cuantificación de los inóculos



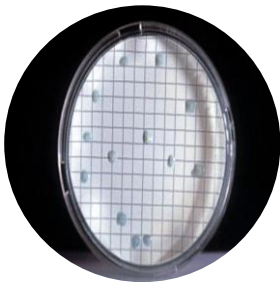
Turbidimetría McFarland



Lectura en espectrofotómetro



Recuento en cámara de Neubauer



Recuento de colonias viables

Turbidimetría McFarland



0,5 McFarland $\sim 10^6$ UFC/mL



Fácil, rápido, económico



Efecto del tamaño de la levadura



Interpretación depende del operario



No distingue células vivas de muertas



Lectura en espectrofotómetro



Recomendado por
algunos estándares



Fácil, rápido



La observación no depende del operario



Efecto del tamaño de la levadura



Es necesario contar con el equipamiento adecuado



No distingue células vivas de muertas



Recuento en cámara de Neubauer



Recomendado por
algunos estándares



Barato



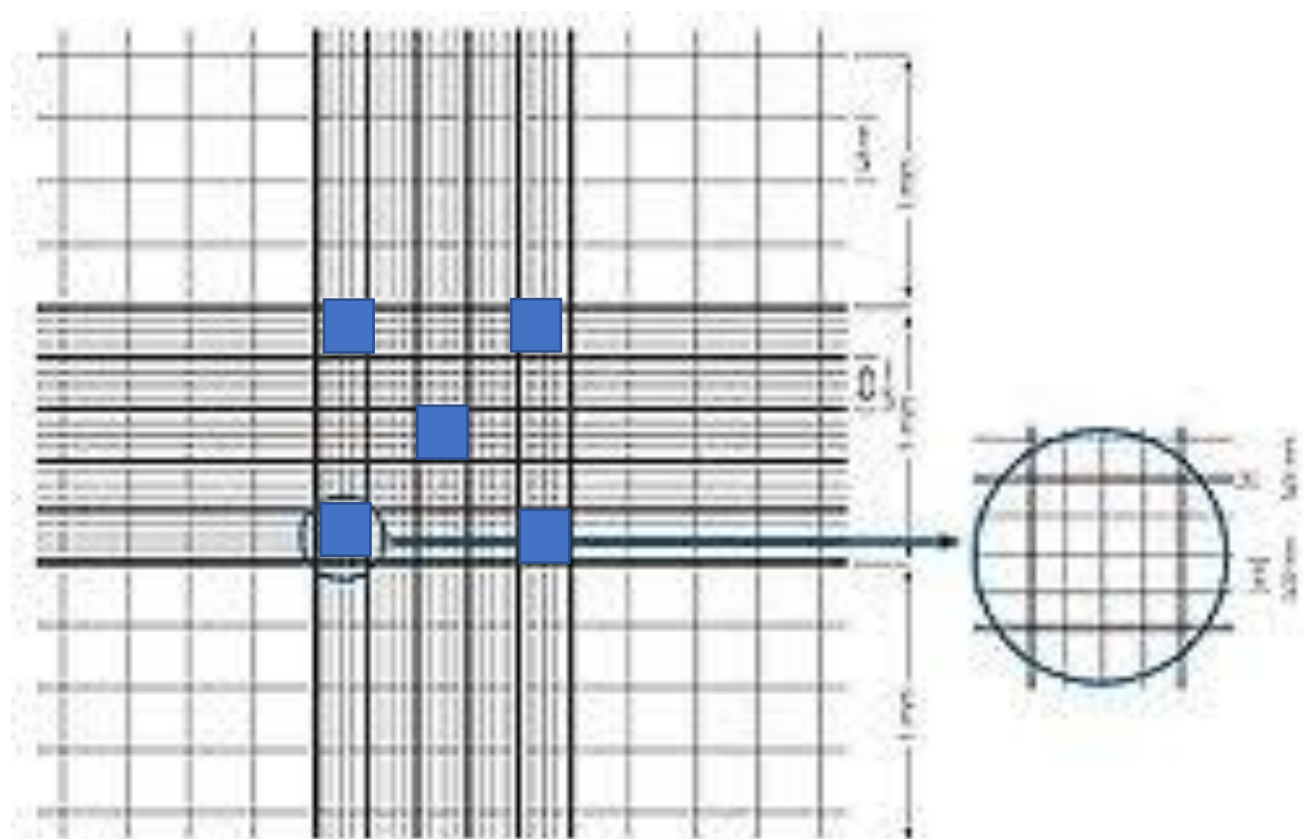
No es afectado por el tamaño de la levadura



No distingue células vivas de muertas



Tedioso



Recuento de colonias viables



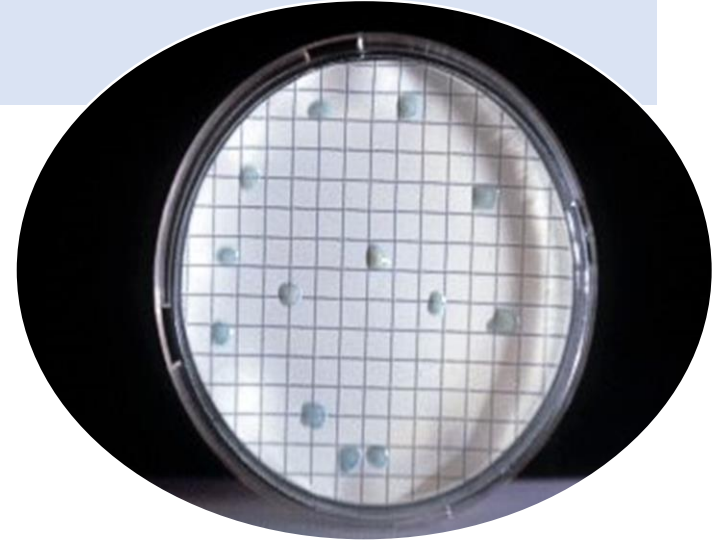
Útil para control de inóculos



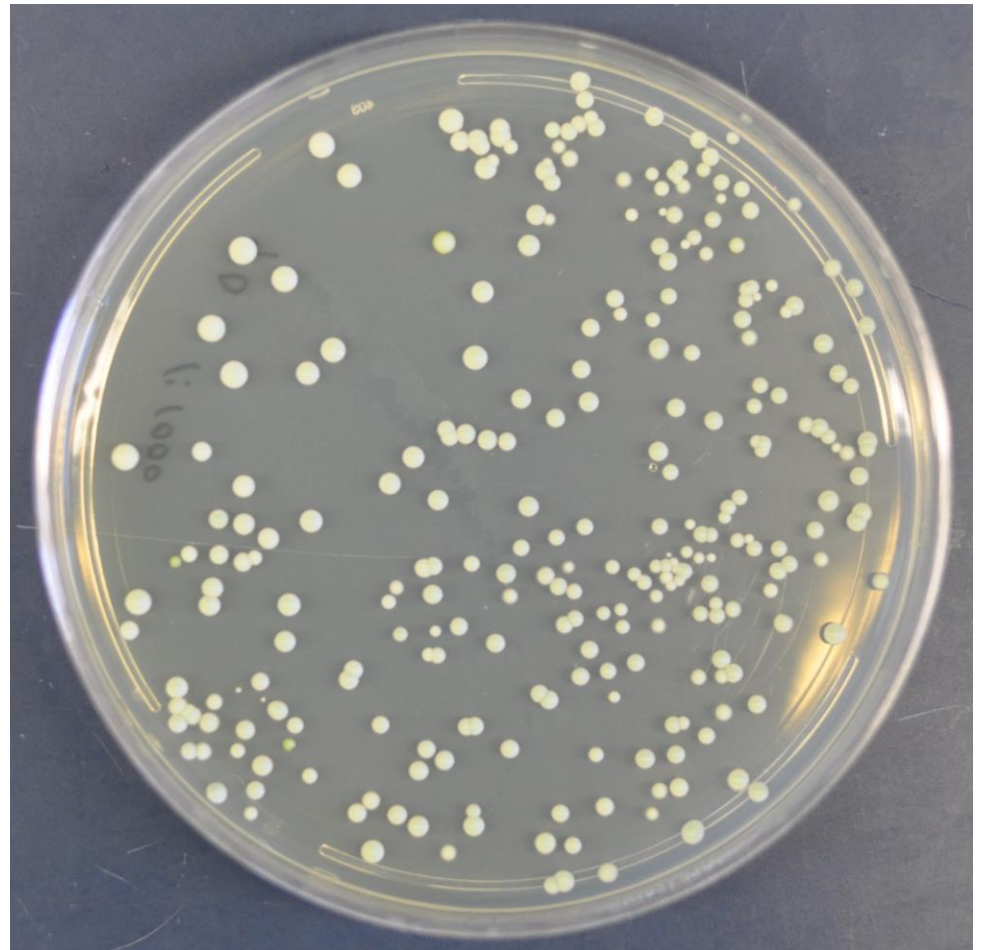
Sólo enumera células viables



Los resultados no son inmediatos

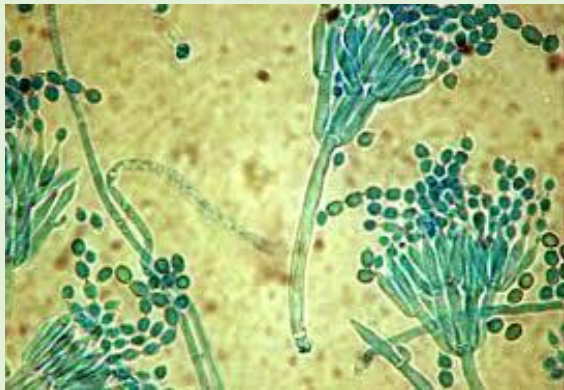
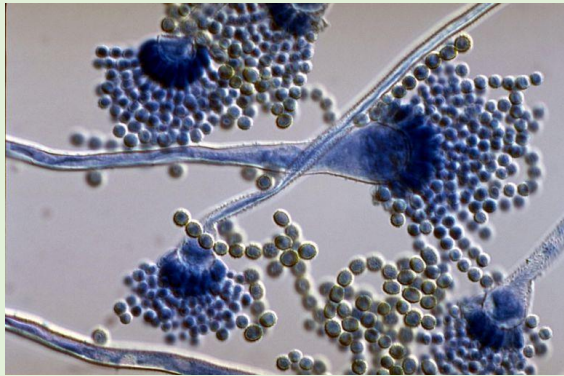


Recuento de colonias viables



Preparación del inóculo: hongos filamentosos

Con conidiación abundante



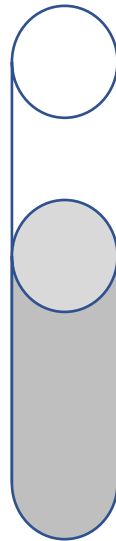
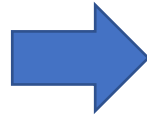
Con conidiación
escasa



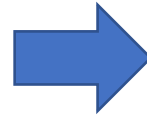
Sin conidiación



Preparación del inóculo



Ajustar 0,5
McFarland



Diluir
1:1000

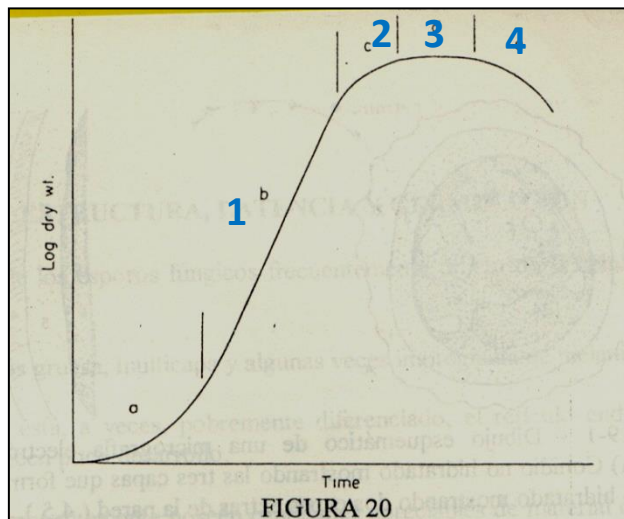


Diluir 1:2000 con
RPMI 1640
 $1 - 5 \times 10^3$ UFC/mL

Conservación:
Máximo 15 minutos a
temperatura ambiente
ó 2 h a 4°C.

Preparación del inóculo: hongos filamentosos

- 1- PROLIFERACIÓN → Crecimiento del micelio
- 2- DISEMINACIÓN → Formación de propágulos asexuales (conidios y esporas asexuales)
- 3- PRESERVACIÓN → Formación de estructuras de resistencia (bulbillos, esclerotes, clamidoconidios)
- 4- SUPERACIÓN → Formación de esporas sexuales (mejoramiento x entrecruzamiento genético)



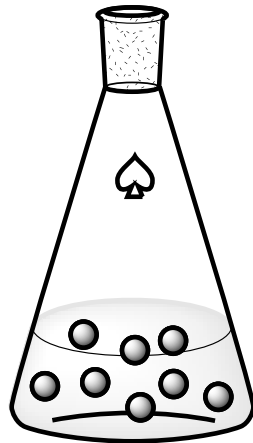
Preparación del inóculo: hongos filamentosos



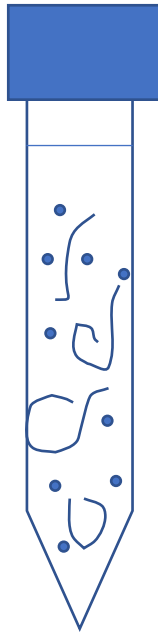
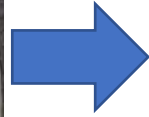
Cultivo en medio, temperatura y tiempo adecuado para una buena esporulación

Cubrir con solución salina y raspar un tip

Para *Aspergillus*, agregar una gota de Tween 20

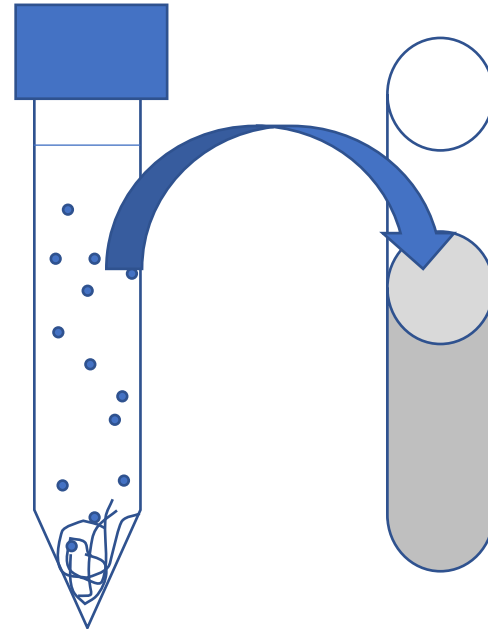
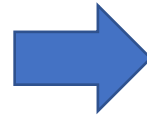


Preparación del inóculo: hongos filamentosos



Transferir a un tubo estéril

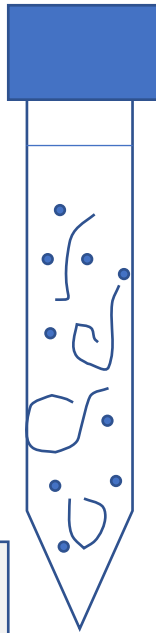
Reposar 3-5 minutos para que sedimenten partículas pesadas.



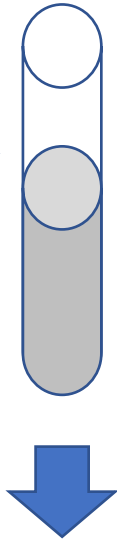
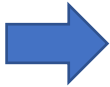
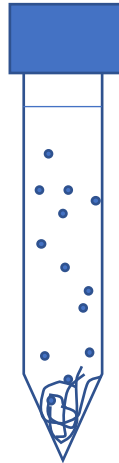
Preparación del inóculo: hongos filamentosos



- Filtrar a través de poro de $11\mu\text{m}$
- Alternativa si hay agregados o muchas hifas
- No se recomienda para macroconidios ni hongos con conidiación escasa



Preparación del inóculo: hongos filamentosos

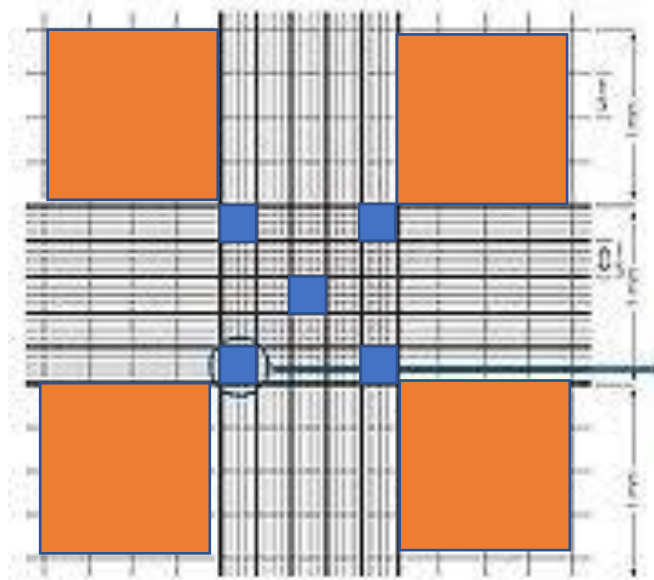
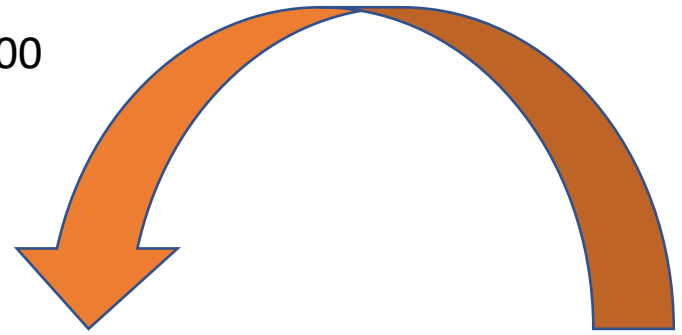


Transferir el sobrenadante a tubo y ajustar la Absorbancia a 530nm



	Intervalo de DO	Intervalo de UFC/ml
<i>Aspergillus flavus</i>	0,09 - 0,11	0,4 - 4,0 x10 ⁶
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,09 - 0,11	0,6 - 5,0 x10 ⁶
<i>Aspergillus nidulans</i>	0,09 - 0,11	1,1 - 2 x10 ⁶
<i>Aspergillus niger</i>	0,1 - 0,42	1,0 - 2,8 x10 ⁶
<i>Aspergillus terreus</i>	0,09 - 0,11	0,9 - 5 x10 ⁶
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	0,2 - 0,3	0,07 - 0,4 x10 ⁶
<i>Bipolaris spicifera</i>	0,2 - 0,3	0,3 - 3 x10 ⁶
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0,15 - 0,17	0,4 - 3,1 x10 ⁶
<i>Dactylaria constricta</i>	0,15 - 0,17	0,4 - 1 x10 ⁶
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,15 - 0,17	0,8 - 5,0 x10 ⁶
<i>Fusarium solani</i>	0,15 - 0,17	0,5 - 5,9 x10 ⁶
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,09 - 0,13	0,8 - 2,3 x10 ⁶
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,05 - 0,15	1,1 - 3,5 x10 ⁶
<i>Pseudallescheria boydii</i>	0,15 - 0,17	1,0 x10 ⁶
<i>Penicillium spp.</i>	0,08 - 0,31	1,9 - 2,7 x10 ⁶
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0,15 - 0,17	0,4 - 3,2 x10 ⁶
<i>Scedosporium prolificans</i>	0,15 - 0,17	0,6 - 1,7 x10 ⁶
<i>Scopulariosis brevicaulis</i>	0,18 - 1,2	0,2 - 4,5 x10 ⁶
<i>Sporotrix schenkei</i>	0,09 - 0,11	2,4 x10 ⁶
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,09 - 0,11	0,7 - 2,3 x10 ⁶
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,15 - 0,17	0,4 - 2,6 x10 ⁶
<i>Wangiella dermatitidis</i>	0,15 - 0,17	1,2 - 3,7 x10 ⁶

Concentración=Elementos contados x 2.500



Concentración=Elementos contados x 50.000

Cuando se utilizan hongos de conidiación pobre. Ejemplo: algunos dermatofitos



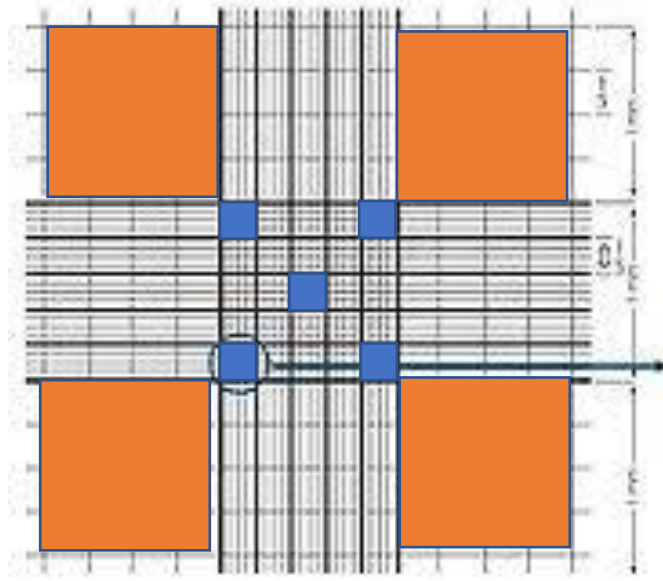
Cultivar en medios pobres como Agar avena, Juice V8



Algunos hongos incrementan la conidiación con ciclos de luz/oscuridad

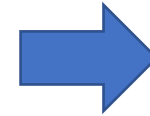
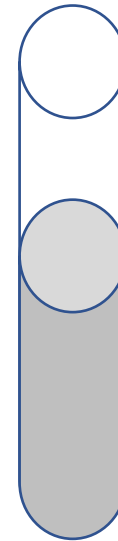
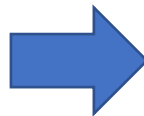
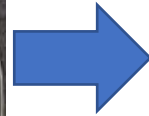


No filtrar

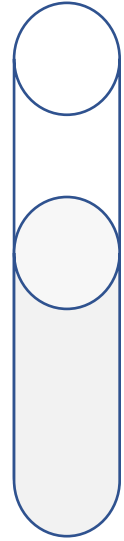


K. Nishimura

Preparación del inóculo

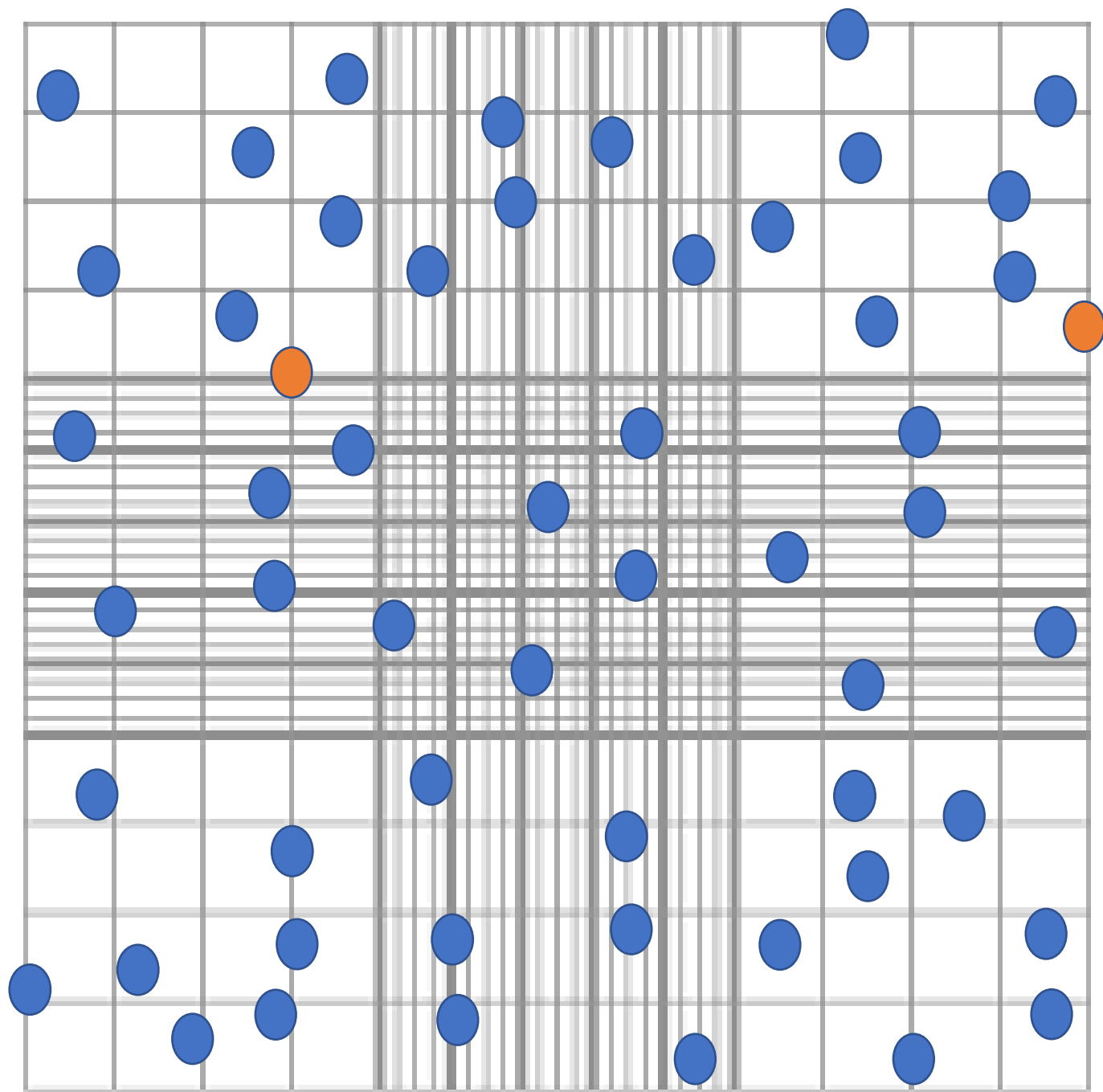


Diluir



$0,4-5,0 \times 10^4$
UFC/mL

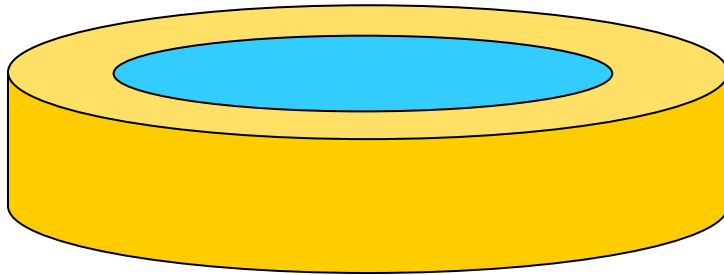
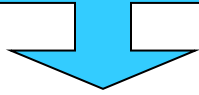
- Se puede conservar a -20°C
- Verificar viabilidad antes de usar



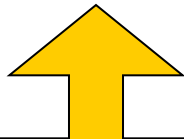
Método de difusión

Métodos de difusión

Compuesto evaluado

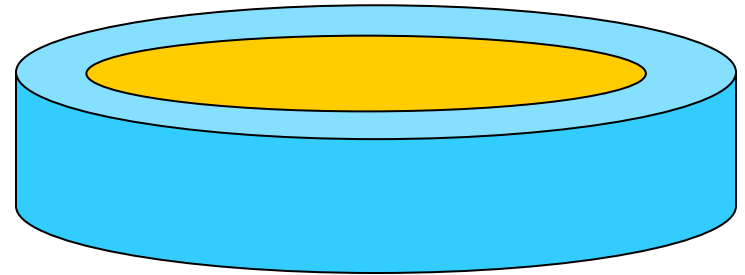
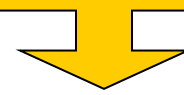


Medio de cultivo
conteniendo
el **microorganismo**

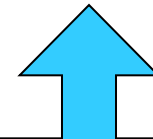


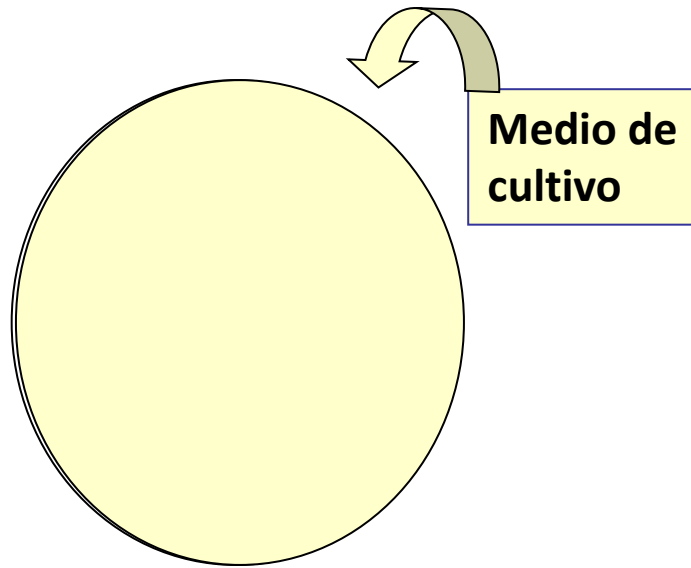
Métodos de dilución

Microorganismo



Medio de cultivo
conteniendo
el **compuesto evaluado**

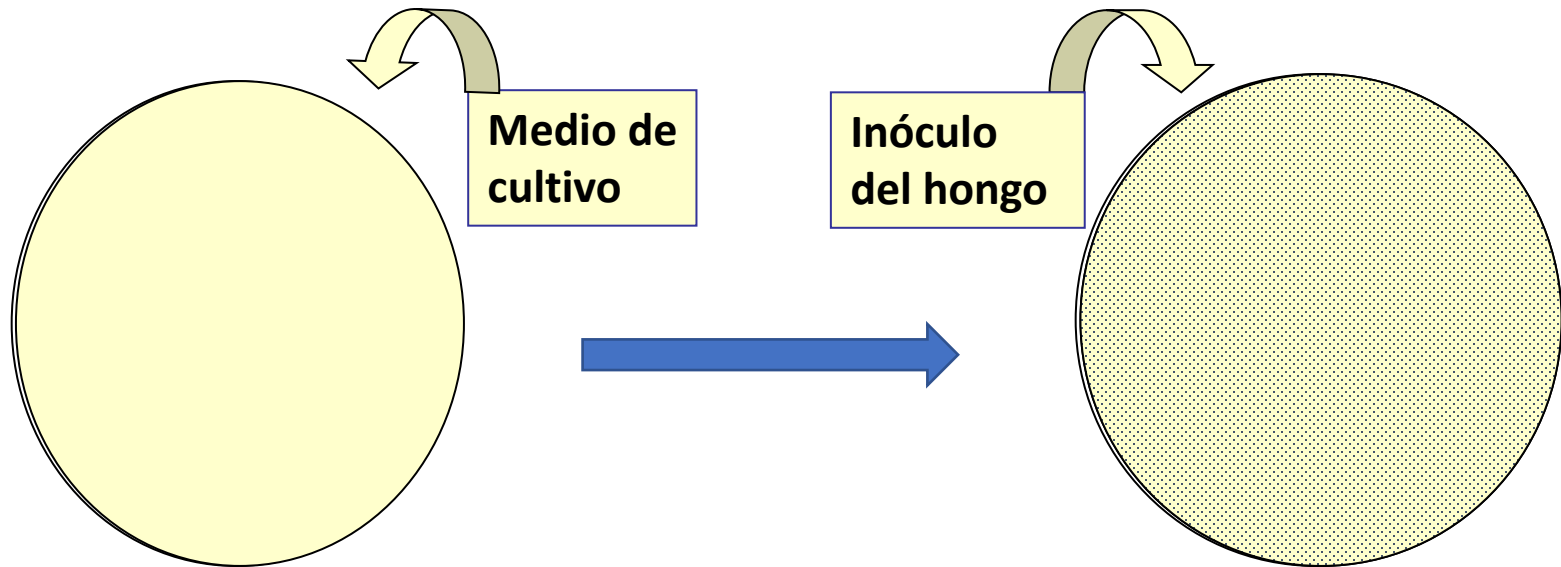




Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con

- 2% de glucosa
- 0,5 µg/ml de azul de metileno

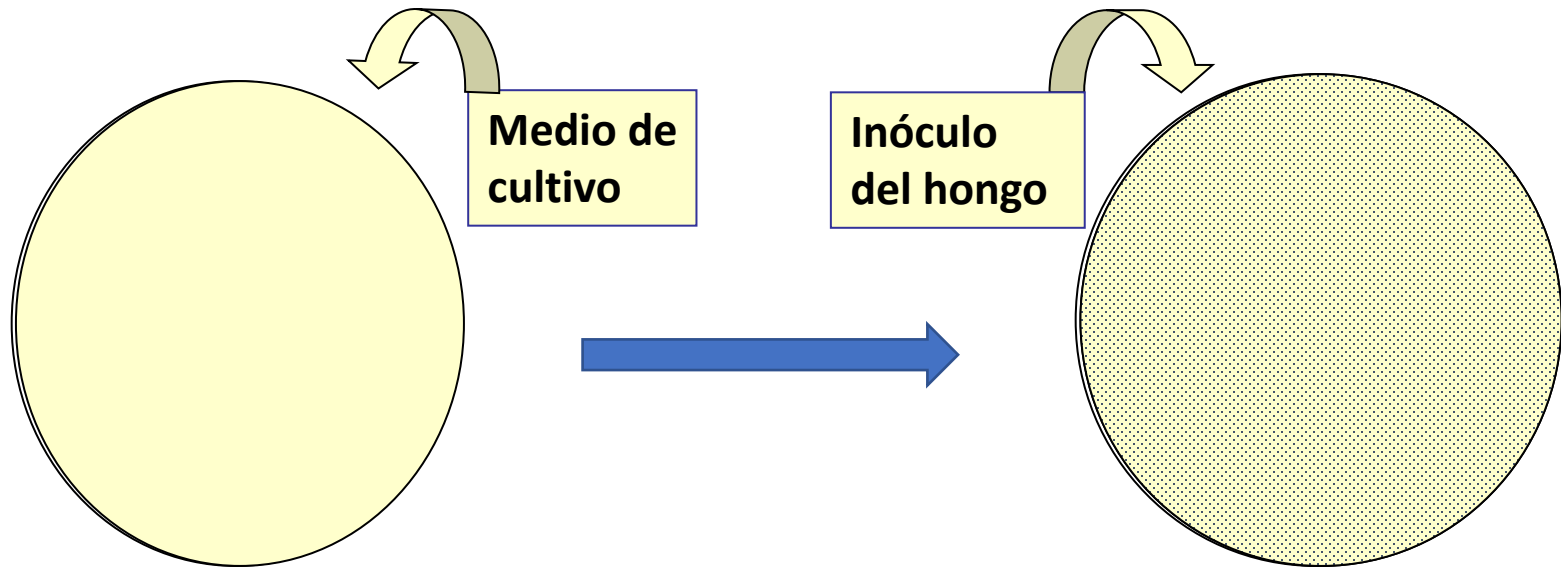
pH 7,2 - 7,4



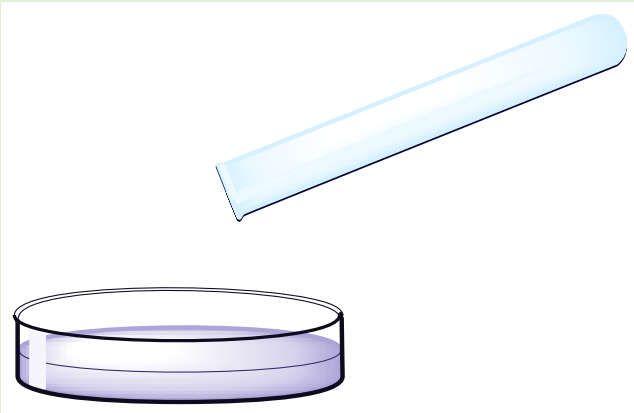
Opción 1: por hisopado



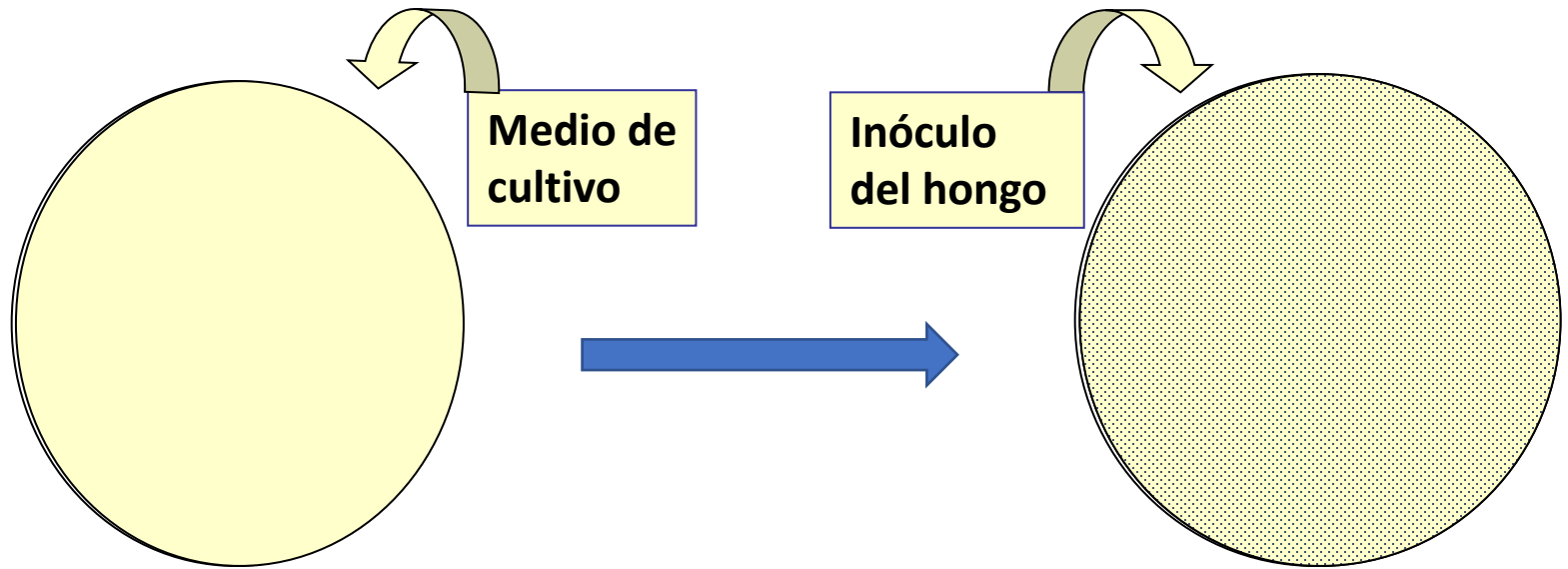
1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
3. Sembrar la placa uniformemente.
4. Dejar secar 3-5 min con la placa entreabierta.



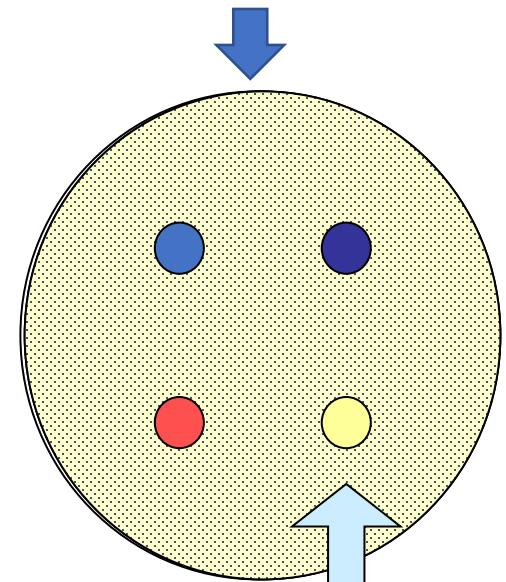
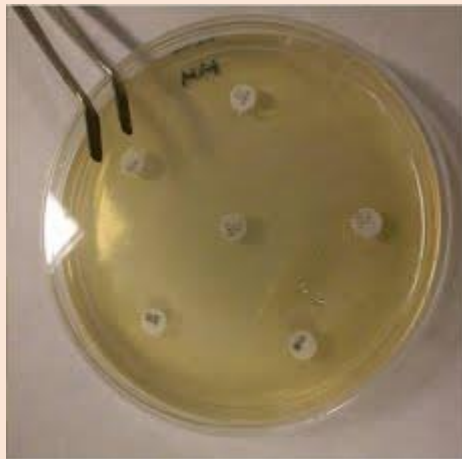
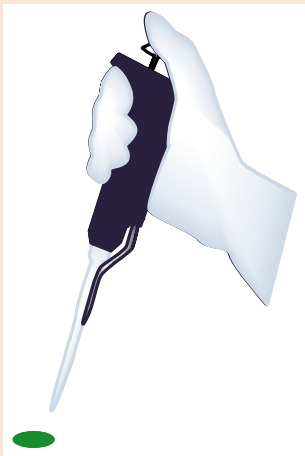
Opción 2: por inundación



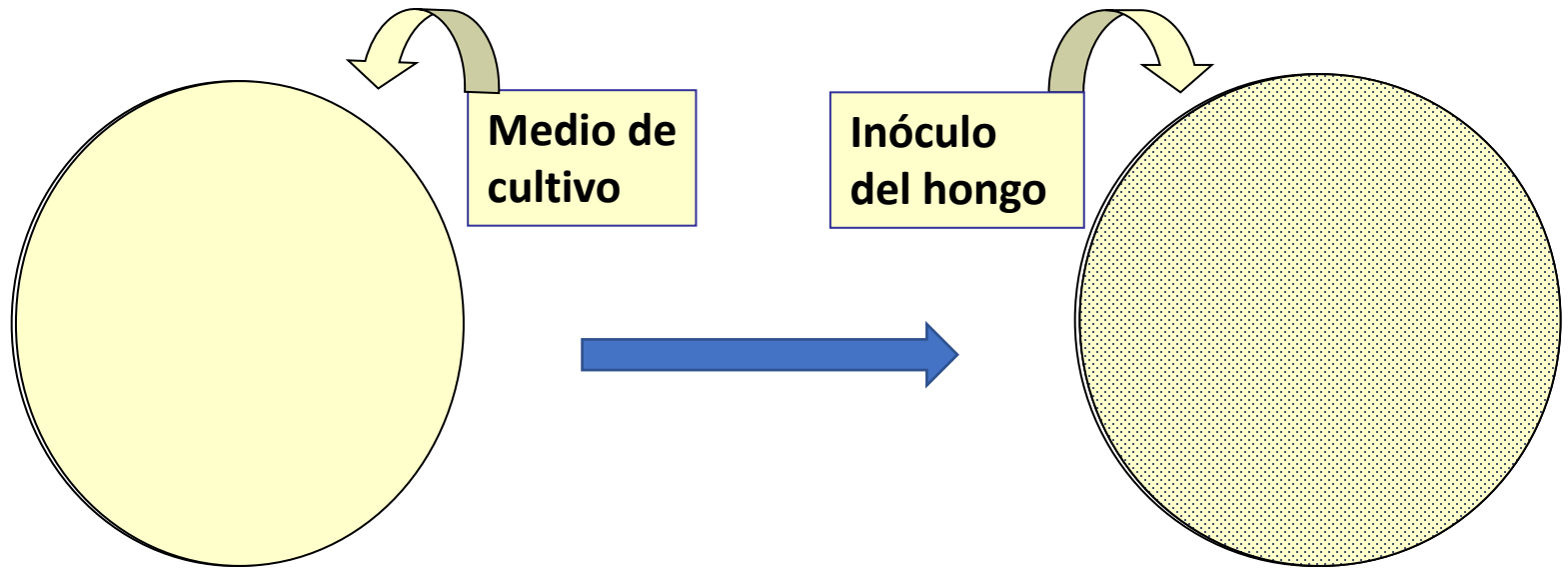
1. Realizar una dilución 1/10 del inóculo 0.5 McFarland.
2. Volcar 2-4 ml la placa de Petri y distribuir homogeneamente
3. Retirar el exceso de líquido con una pipeta Pasteur estéril.
4. Dejar secar 15 min con la placa entreabierta.



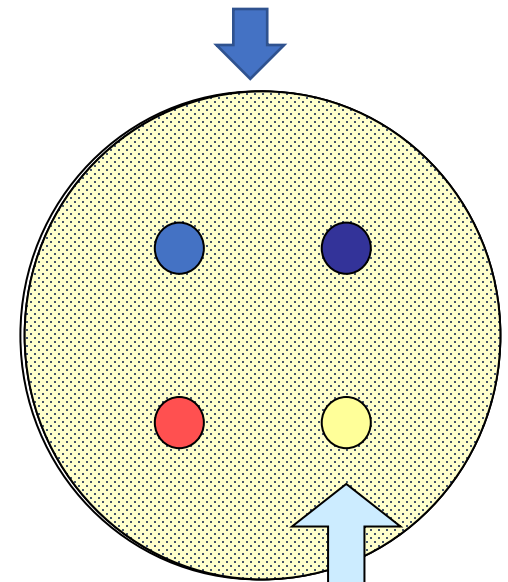
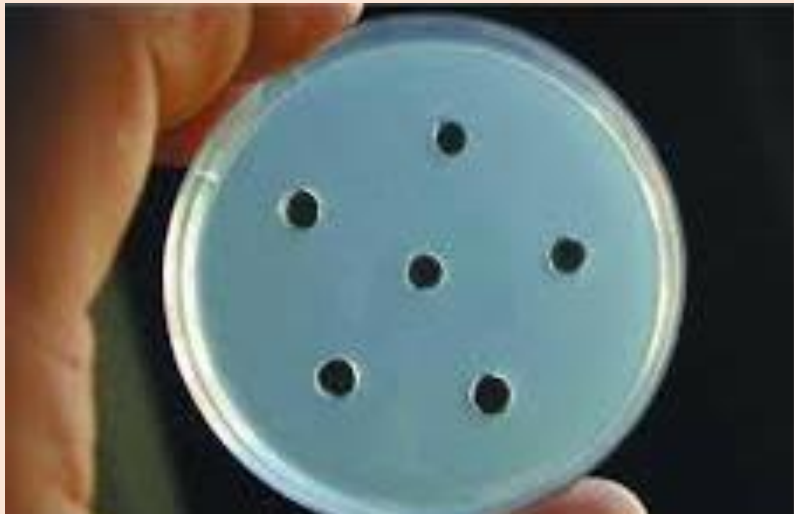
Opción 1: discos de papel

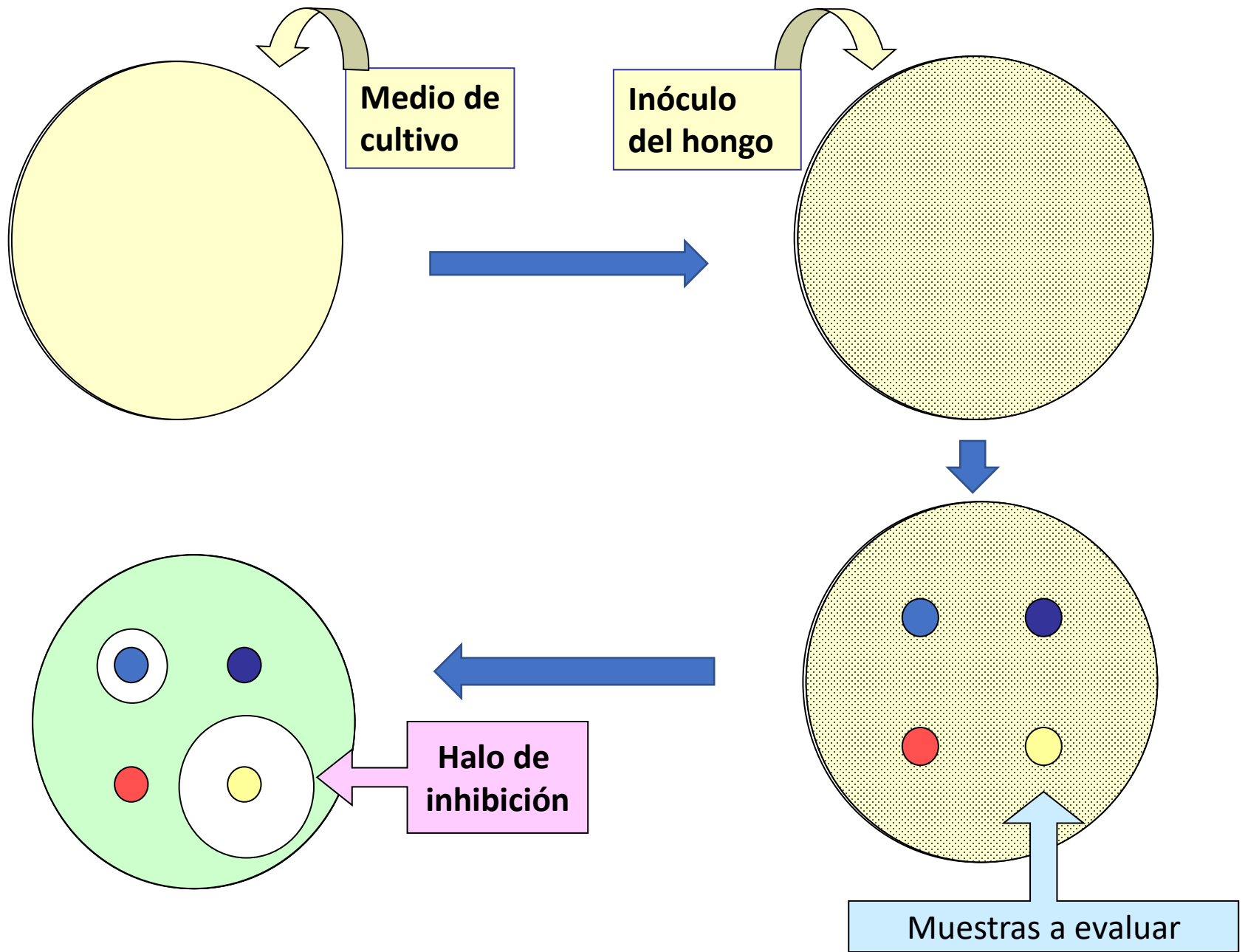


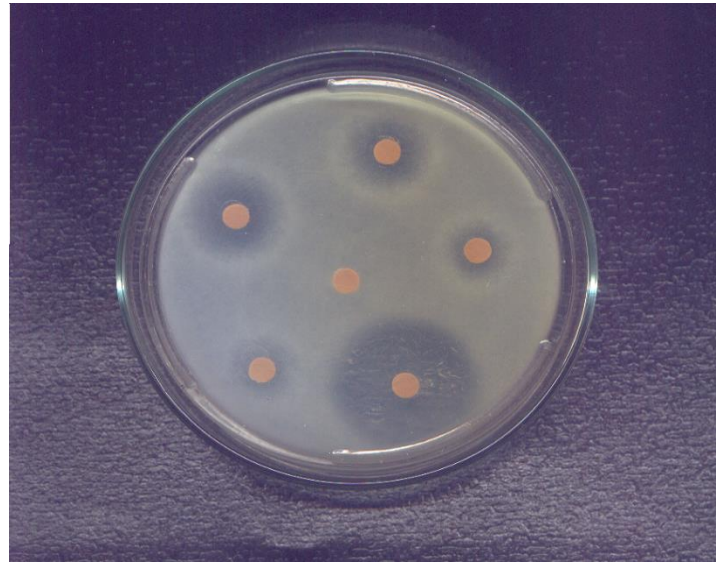
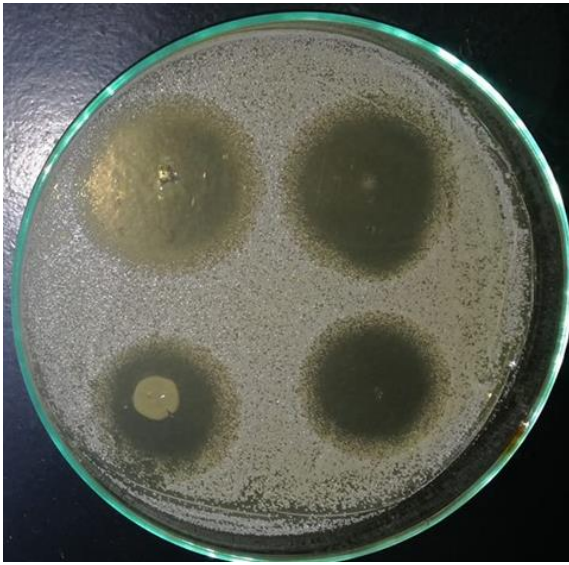
Muestras a evaluar



Opción 2: pozos en el agar







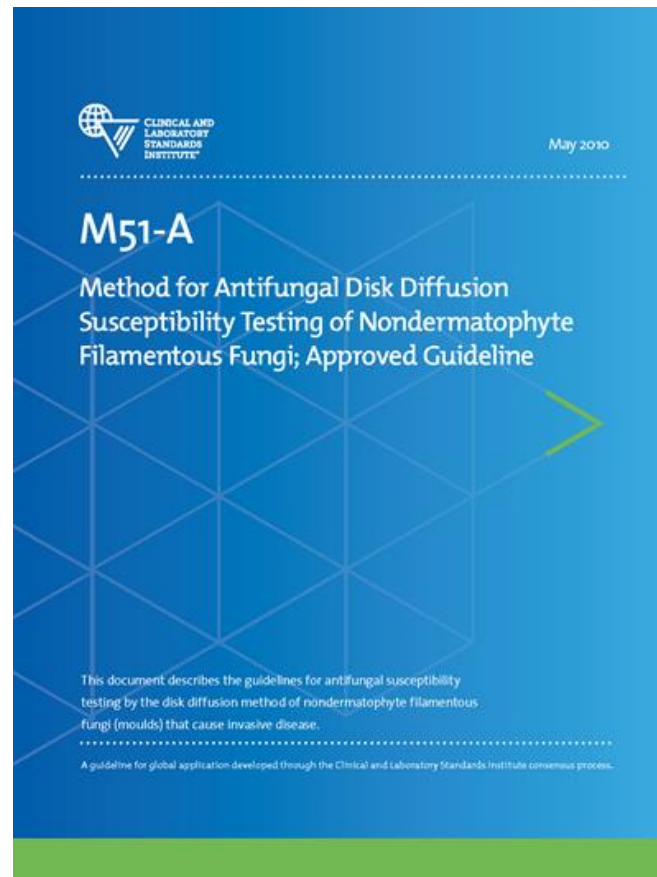
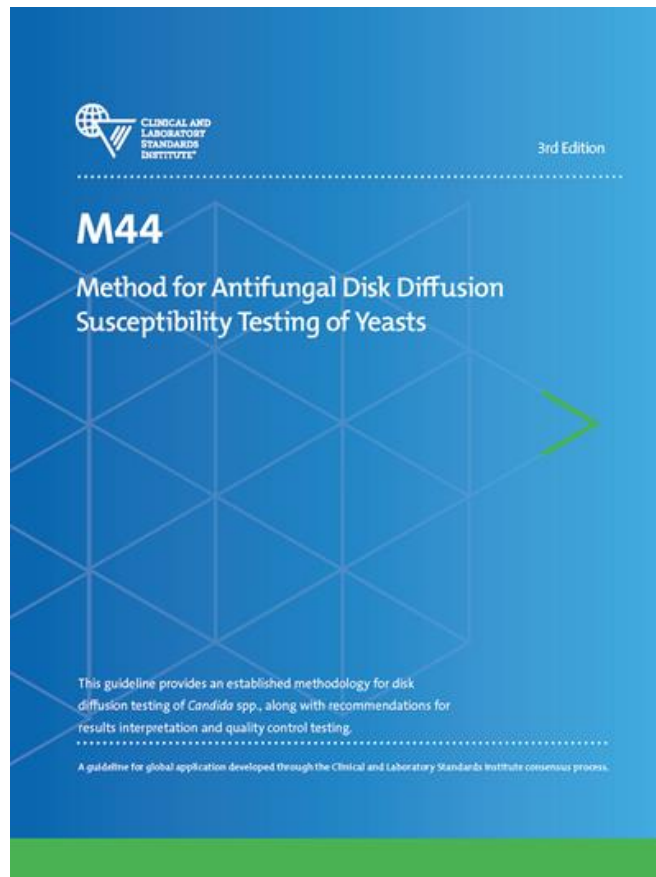
- ✓ Fácil
- ✓ Económico
- ✓ Se necesita poca cantidad de muestra
- ✓ Posibilidad de evaluar varias muestras en un mismo ensayo
- ✓ El tamaño del halo depende de muchos factores:
 - ✓ Del compuesto: lipoficidad, volatilización, cantidad de compuesto,
 - ✓ Del medio de cultivo: composición, pH, altura
- ✓ El halo no permite obtener conclusiones cuantitativas.

Clinical and Laboratory Standard Institute

<https://clsi.org/meetings/sub-antifungal/>

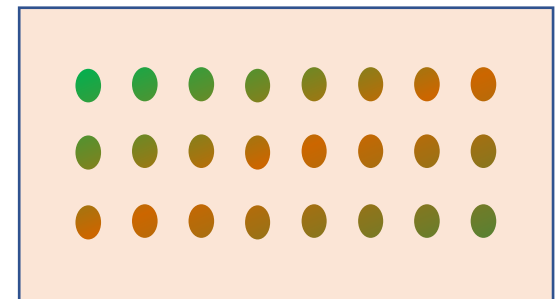
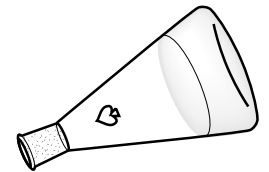
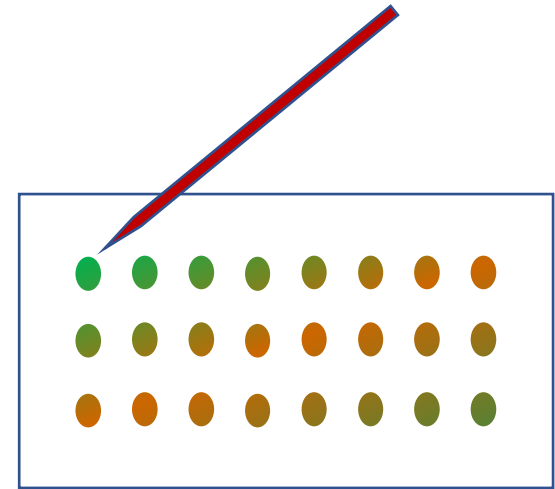


Métodos de difusión

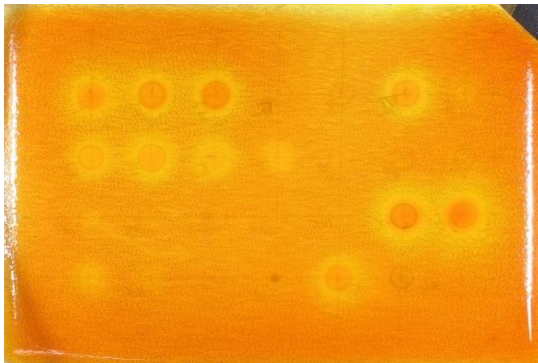


Bioautografía

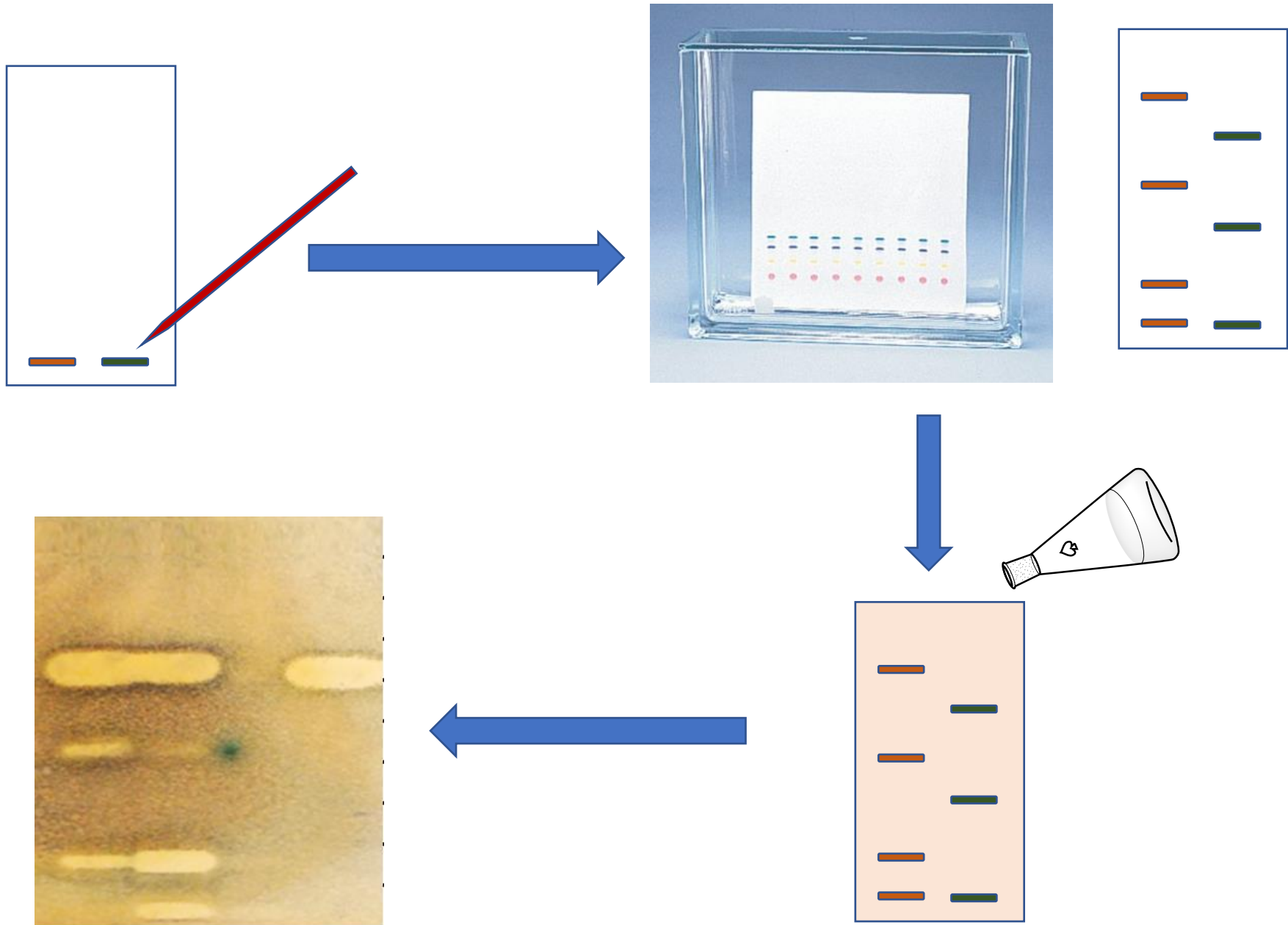
Bioautografía puntual



Revelado con solución de MTT (1mg/mL). Incubar 2 horas a 30°C



Bioautografía desarrollada





- ✓ Permite determinar fácilmente las fracciones activas de un extracto.
- ✓ Muy sensible
- ✓ Dificultad de aplicación en hongos de crecimiento lento.
- ✓ Necesidad de la utilización de un compuesto revelador.
- ✓ Efecto de la solubilidad de los compuestos.

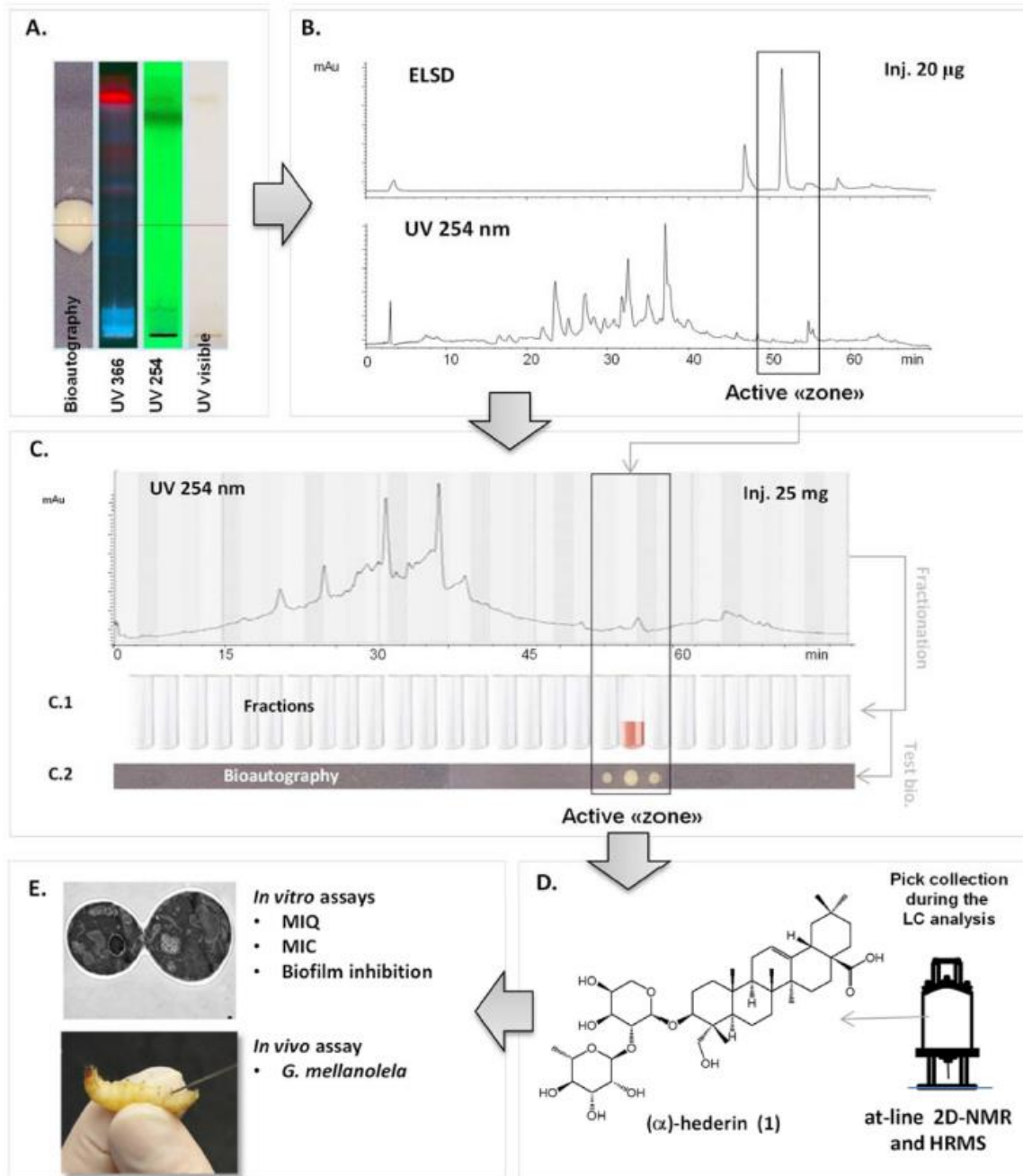
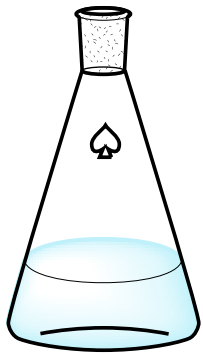


Figure 1. (A) HPTLC analysis and antifungal bioautographic of the methanolic extract of the leaves of *Schefflera systyla*; (B) HPLC-PDA-ELSD analysis of the active extract; (C) HPLC-activity profiling by microfractionation at the semi preparative (C1) followed with an agar overlay bioautographic against the mutant strain of *C. albicans*; (D) NMR and HRMS analyses of the active fraction; (E) *in vivo* and *in vitro* antifungal activity against the wild-type strain.

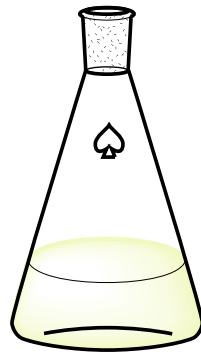
Métodos para evaluar mecanismos de acción

Test de Sorbitol

Preparación de medios de cultivo

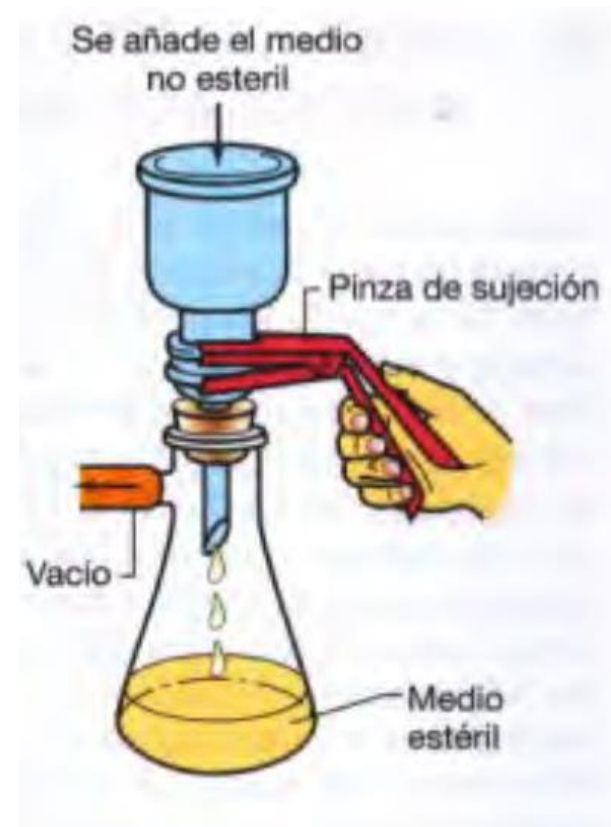


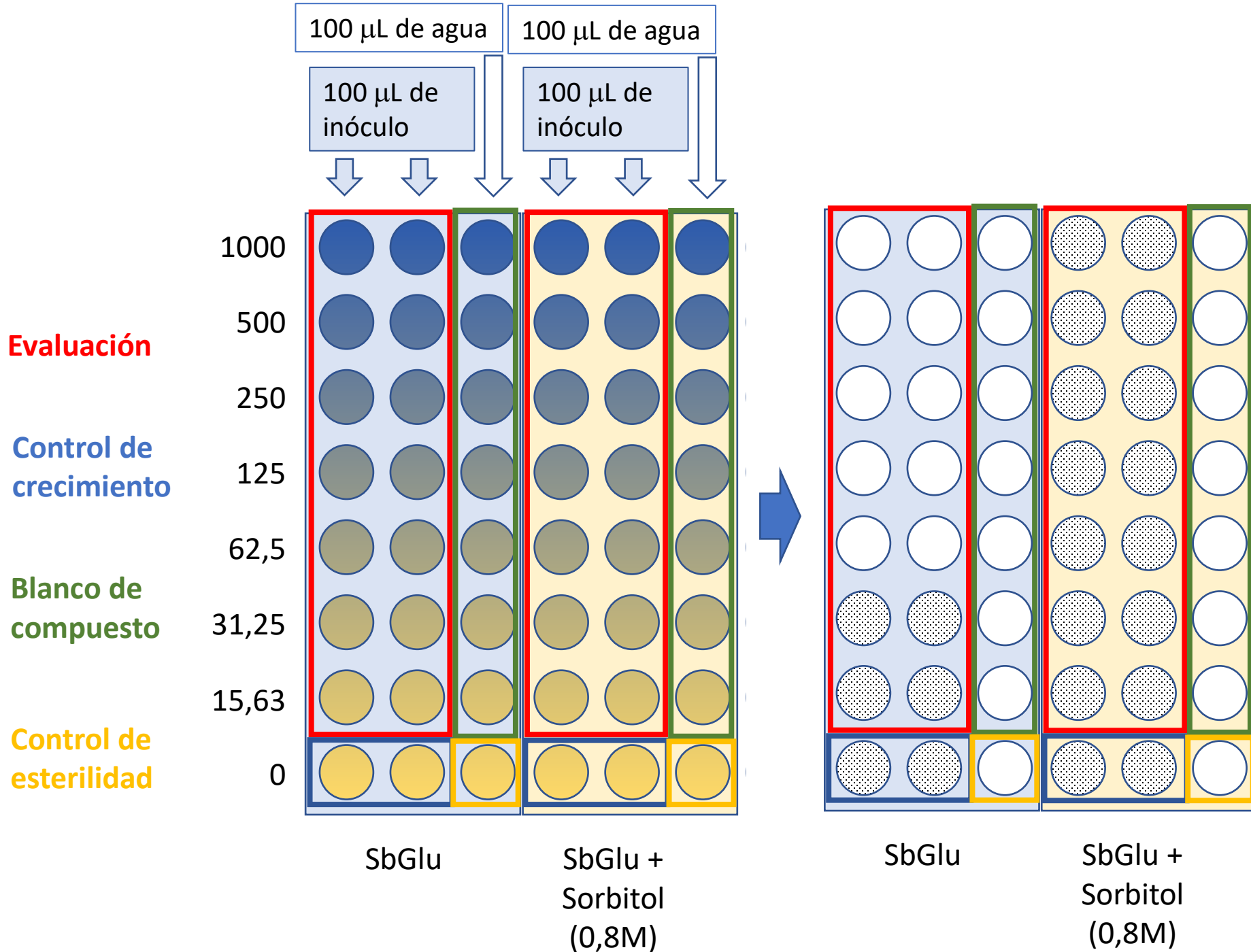
SbGlu



SbGlu +
Sorbitol (0,8M)

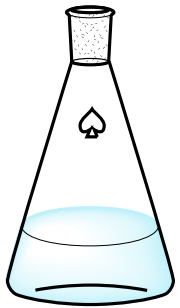
Esterilizar por filtración



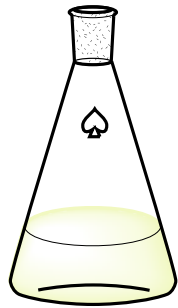


Test de Ergosterol

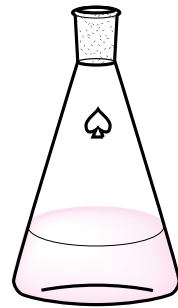
Preparación de medios de cultivo



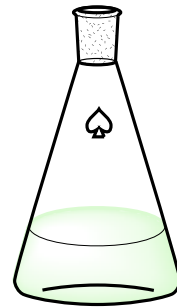
SbGlu



SbGlu +
50 µg/mL
ergosterol



SbGlu +
100 µg/mL
ergosterol



SbGlu +
200 µg/mL
ergosterol

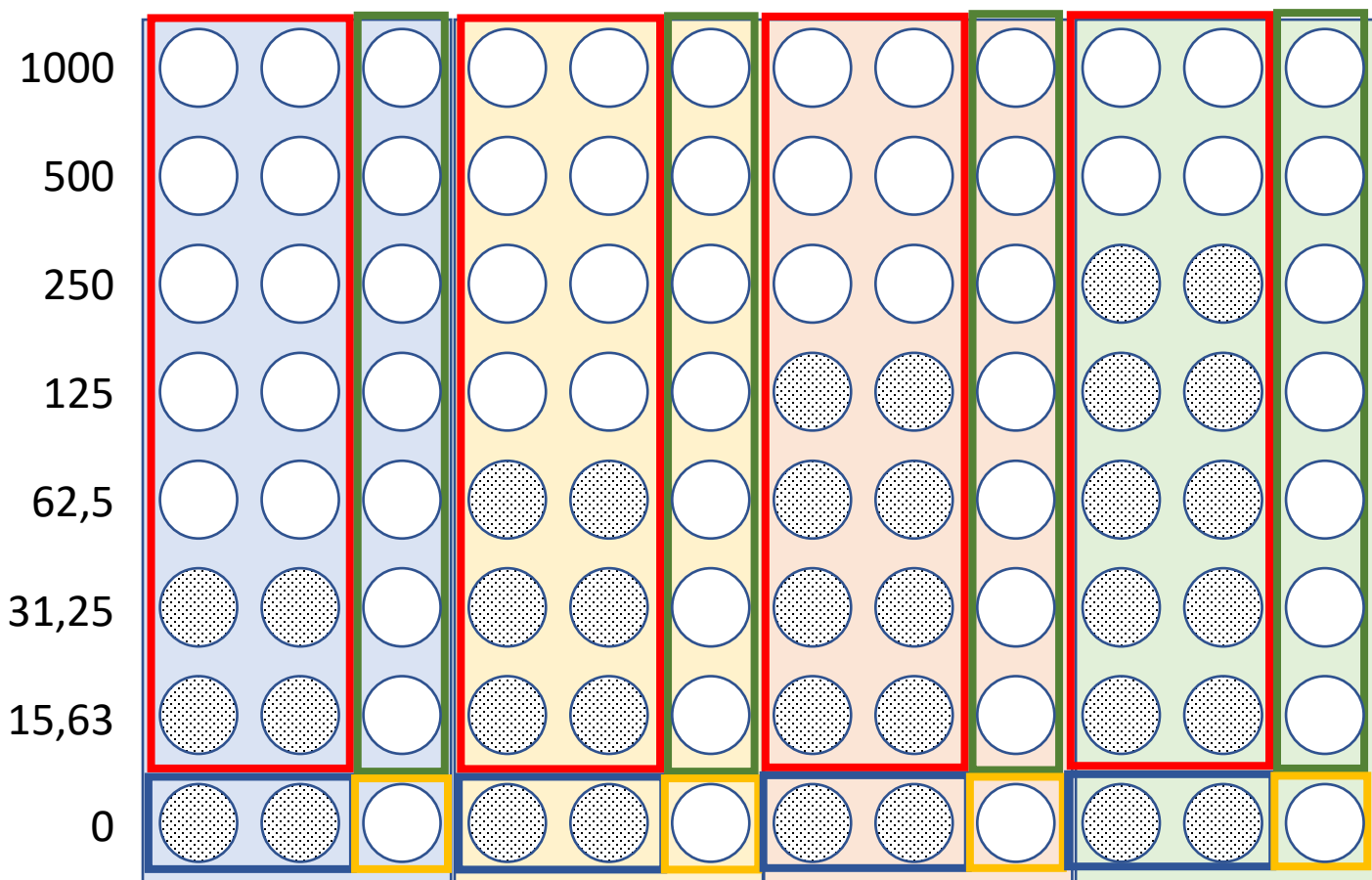
Esterilizar por filtración

Evaluación

**Control de
crecimiento**

**Blanco de
compuesto**

**Control de
esterilidad**



SbGlu

SbGlu +
50 µg/mL
ergosterol

SbGlu +
100 µg/mL
ergosterol

SbGlu +
200 µg/mL
ergosterol

CIM:
62,5 µg/mL

CIM:
125 µg/mL

CIM:
250 µg/mL

CIM:
500 µg/mL

Antifungal Activity of *Salvia miltiorrhiza* Against *Candida albicans* Is Associated with the Alteration of Membrane Permeability and (1,3)- β -D-Glucan Synthase Activity

Heung-Shick Lee¹ and Younhee Kim^{2*}

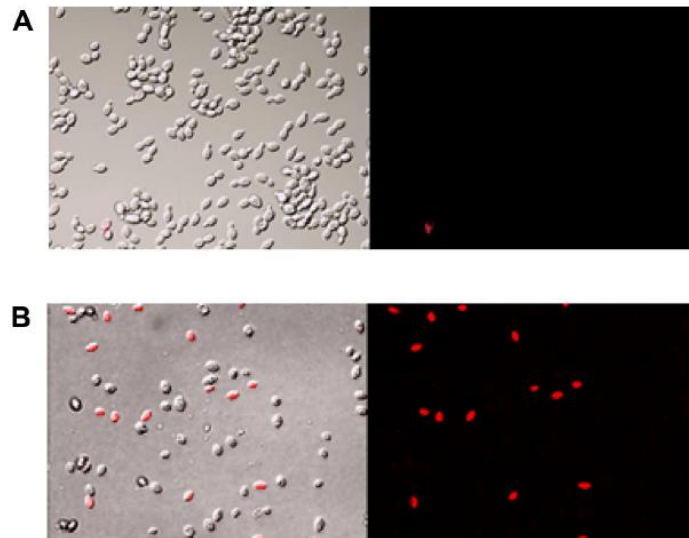


Fig. 1. Effect of *S. miltiorrhiza* on the *C. albicans* ATCC 18804 cell membrane.

(A) Untreated cells; (B) cells treated with 1× MIC *S. miltiorrhiza* for 3 h

Table 3. Effect of exogenous ergosterol on the MIC of *S. miltiorrhiza* against *C. albicans* ATCC 18804.

Test agents	MIC (μ g/ml)			
	2 days		7 days	
	-ergosterol	+ergosterol	-ergosterol	+ergosterol
<i>S. miltiorrhiza</i>	39	39	39	39
Amphotericin B	1	2	1	2

Table 4. Effect of sorbitol on the MIC of *S. miltiorrhiza* against *C. albicans* ATCC 18804.

Test agents	MIC (μ g/ml)			
	2 days		7 days	
	-sorbitol	+sorbitol	-sorbitol	+sorbitol
<i>S. miltiorrhiza</i>	39	156	39	>1,248
Amphotericin B	1	1	1	1

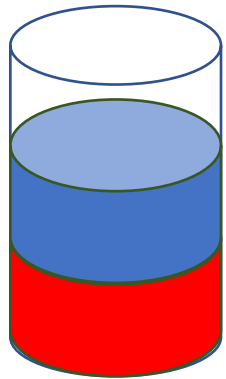
Table 5. Effect of *S. miltiorrhiza* on (1,3)- β -D-glucan synthase activity.

<i>S. miltiorrhiza</i>	Fluorescence (AU)	(1,3)- β -D-Glucan synthase activity (%)
0	42,851 $\pm$ 479	100
2× MIC	41,196 $\pm$ 1,375	96.1
4× MIC	37,688 $\pm$ 2,317	87.9
8× MIC	36,041 $\pm$ 1,434**	84.1

Relative (1,3)- β -D-glucan synthase activity was expressed as a percent to determine the changes in (1,3)- β -D-glucan synthase activity caused by each treatment. Each value represents the average $\pm$ SE of quadruplicates. AU: arbitrary unit. ** p < 0.01.

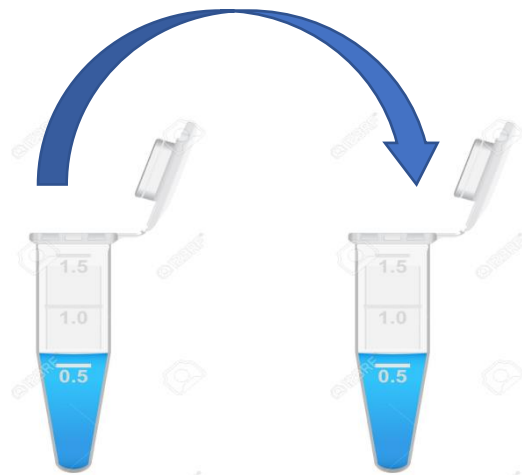
Metodologías para evaluar
interacciones: tablero de ajedrez

- Método microdilución



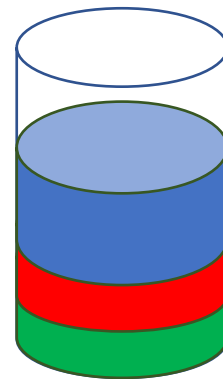
100 µL inóculo

100 µL solución de trabajo



Solución stock
50 mg/mL en
DMSO

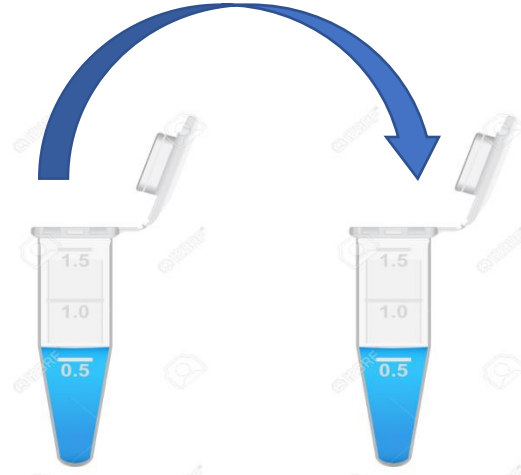
Solución de trabajo
2000 µg/mL
en RPMI 2x



100 µL inóculo

50 µL solución de trabajo A

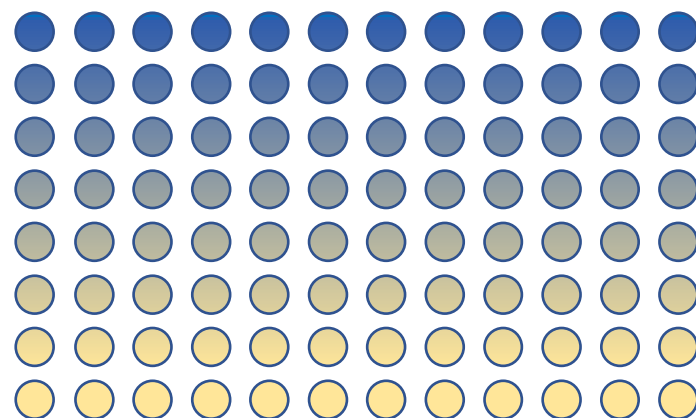
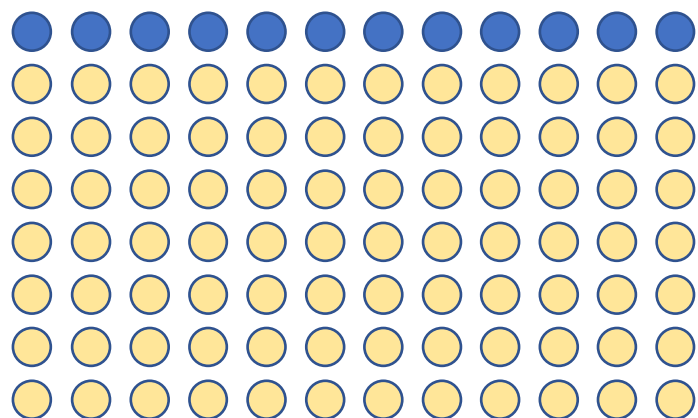
50 µL solución de trabajo B



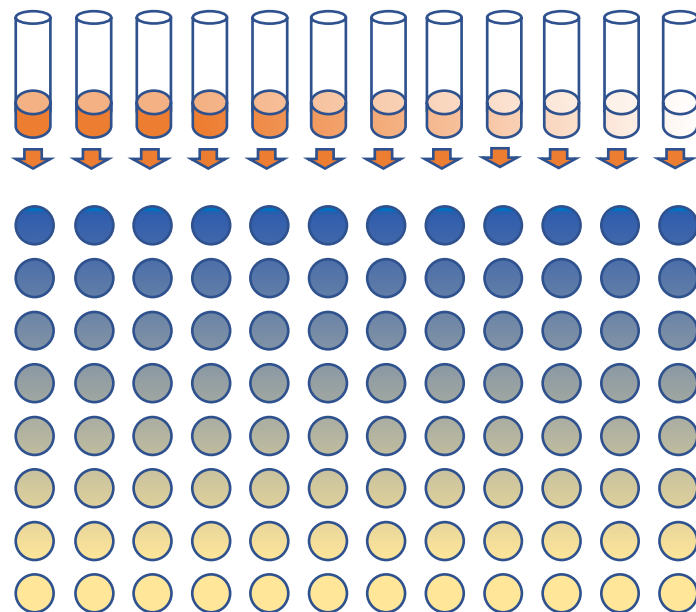
Solución stock
50 mg/mL en
DMSO

Solución de trabajo
????? µg/mL
en RPMI 2x

Compuesto A

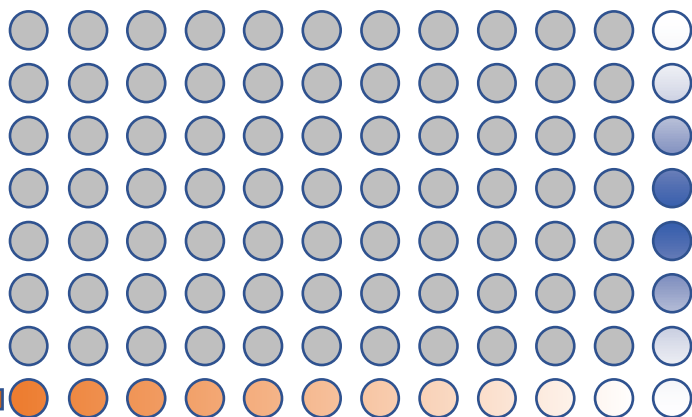


Compuesto B



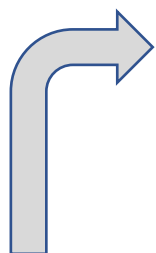
Combinaciones de compuestos

Compuesto A en solitario



Compuesto B en solitario





Combinaciones de compuestos



Compuesto
A en
solitario



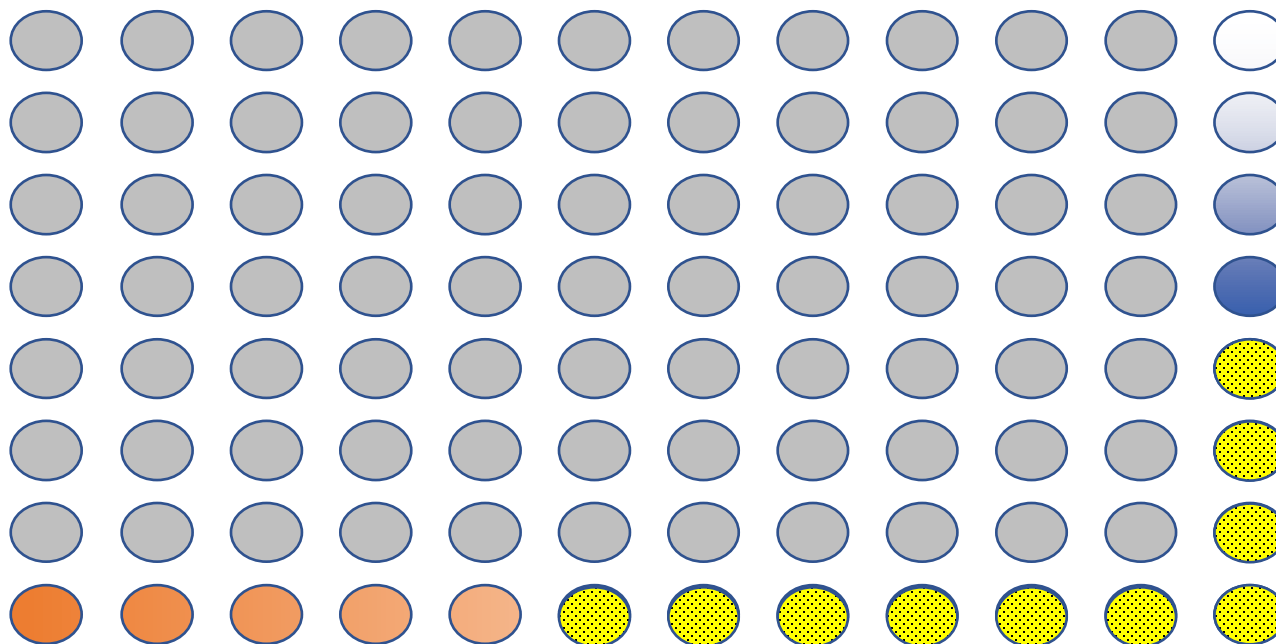
CIM A



CIM B



Compuesto B en solitario



crecimiento

												1000
												500
												250
				g	a	b	c	d	e	f		125
				h								62.5
				i								31.25
				j								15.6
												0
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	

ICIF $\leq 0,5$

SINERGISMO

0,5<ICIF≤4

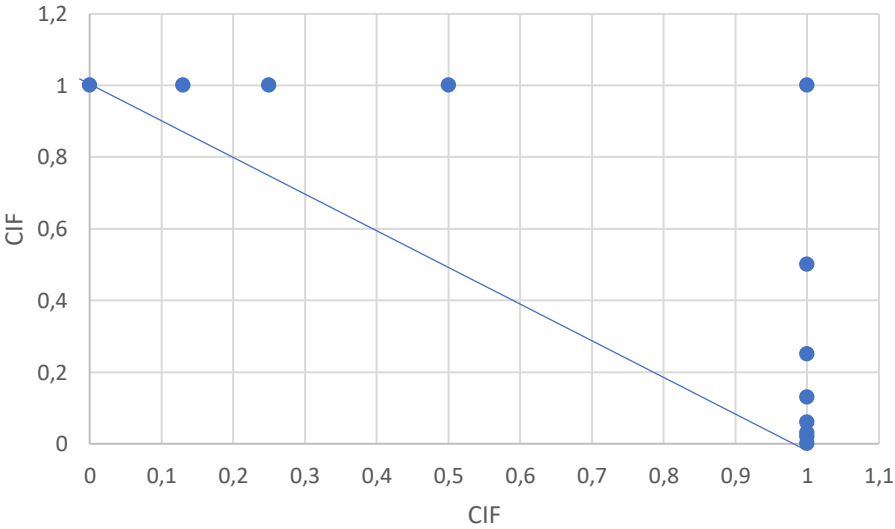
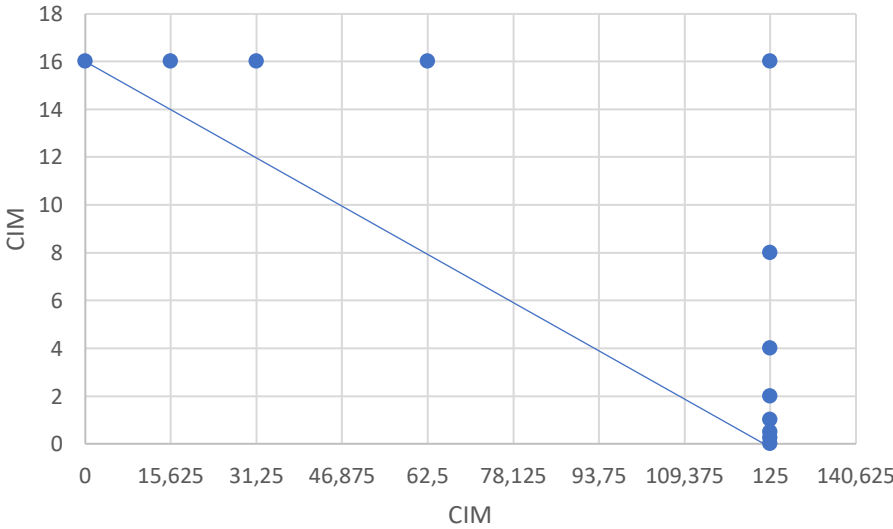
ADITIVISMO

ICIF>4

ANTAGONISMO

[illegible]

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
CIM A solitario	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
CIM A combinación	125	125	125	125	125	125	125	62,5	31,25	15,63
CIM B solitario	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
CIM B combinación	8	4	2	1	0,5	0,25	16	16	16	16
CIF A	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,25	0,13
CIF B	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	1	1	1	1
ICIF	1,5	1,25	1,13	1,06	1,03	1,02	2	1,5	1,25	1,13



Ejemplo de combinación sinérgica

												1000
												500
												250
												125
									d	e		62.5
								b	c			31.25
								a				15.6
												0
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	

	a	b	c	d	e
CIM A solitario	125	125	125	125	125
CIM A combinación	15,6	31,25	31,25	62,5	62,5
CIM B solitario	16	16	16	16	16
CIM B combinación	1	1	0,5	0,5	0,25
CIF A	0,12	0,25	0,25	0,50	0,50
CIF B	0,06	0,06	0,03	0,03	0,02
ICIF	0,19	0,31	0,28	0,53	0,52
	sin	sin	sin	Ad	Ad

ICIF ≤ 0,5

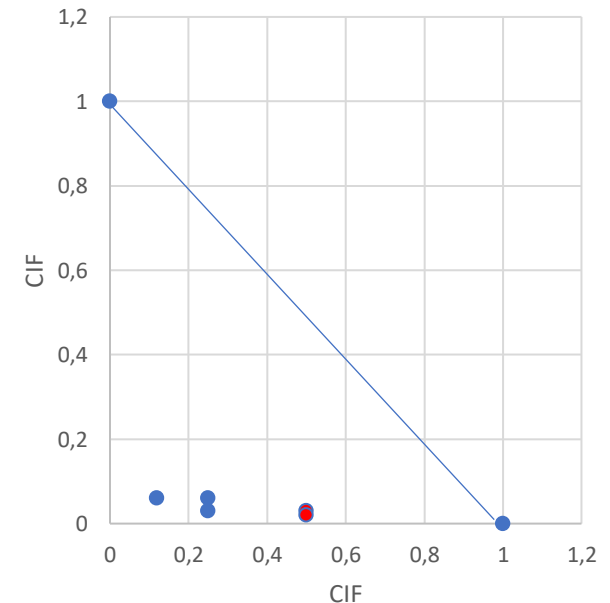
SINERGISMO

0,5 < ICIF ≤ 4

ADITIVISMO

ICIF > 4

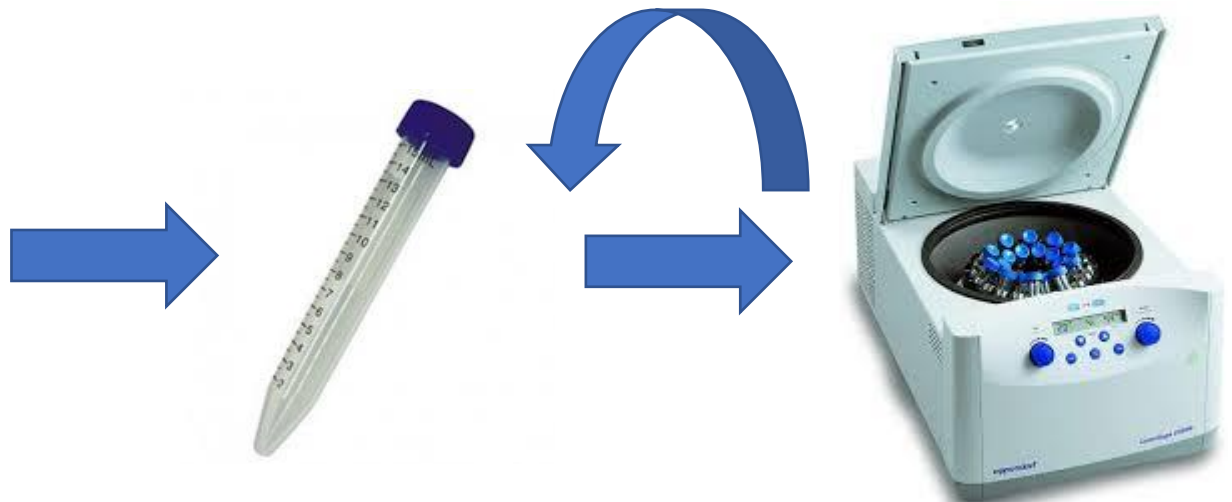
ANTAGONISMO



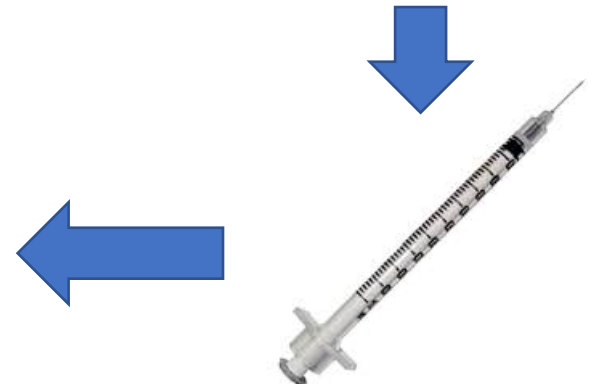
Métodos para evaluar inhibición de factores de virulencia

Inhibición de la adherencia a células epiteliales bucales

- Suspensión de células epiteliales bucales (CEBs)

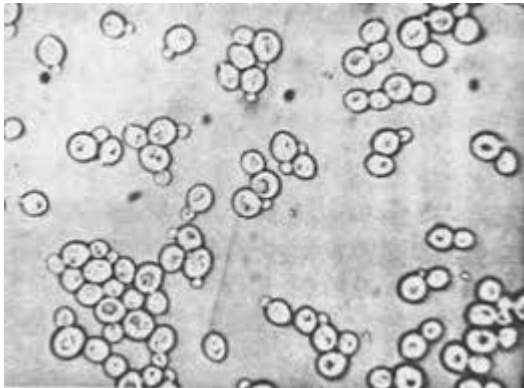
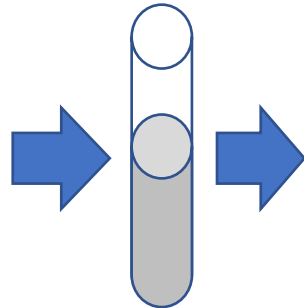


5×10^5 células/mL



Inhibición de la adherencia a células epiteliales bucales

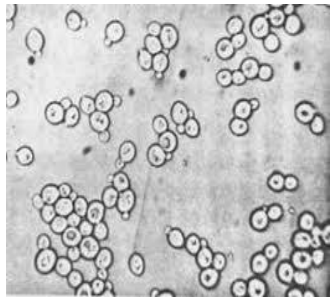
- Inóculo de levaduras



$2,5 \times 10^7$ células/mL

Inhibición de la adherencia a células epiteliales bucales

- Ensayo de adherencia



500 μ L inóculo



500 μ L BECs

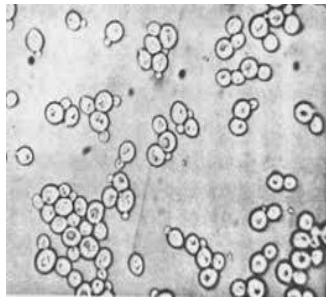


Solución stock



1 h a 37 °C con agitación

CONTROL



500 μ L inóculo

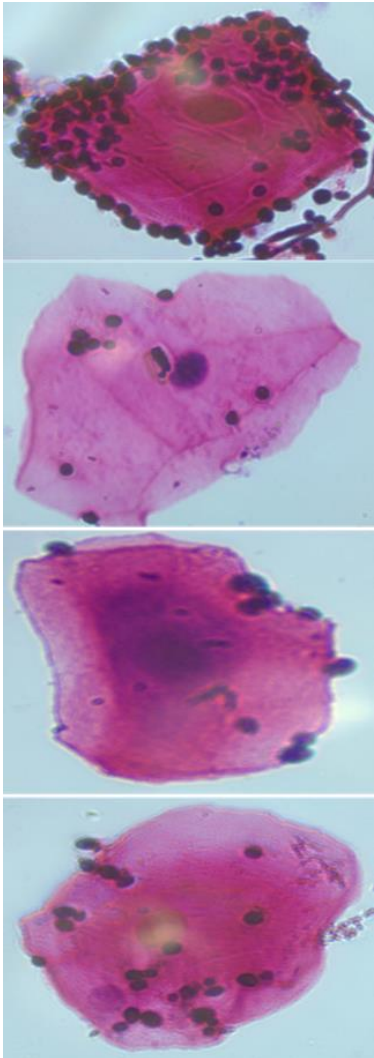


500 μ L BECs

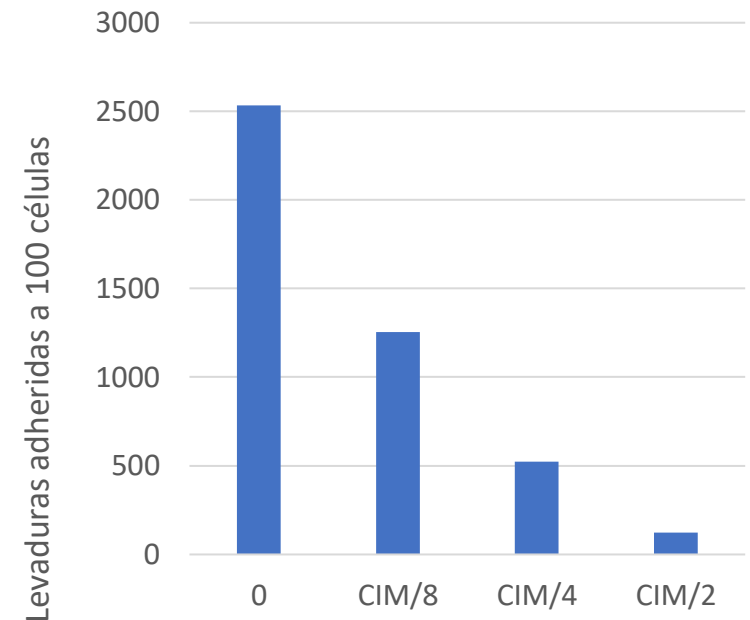


1 h a 37 °C con agitación

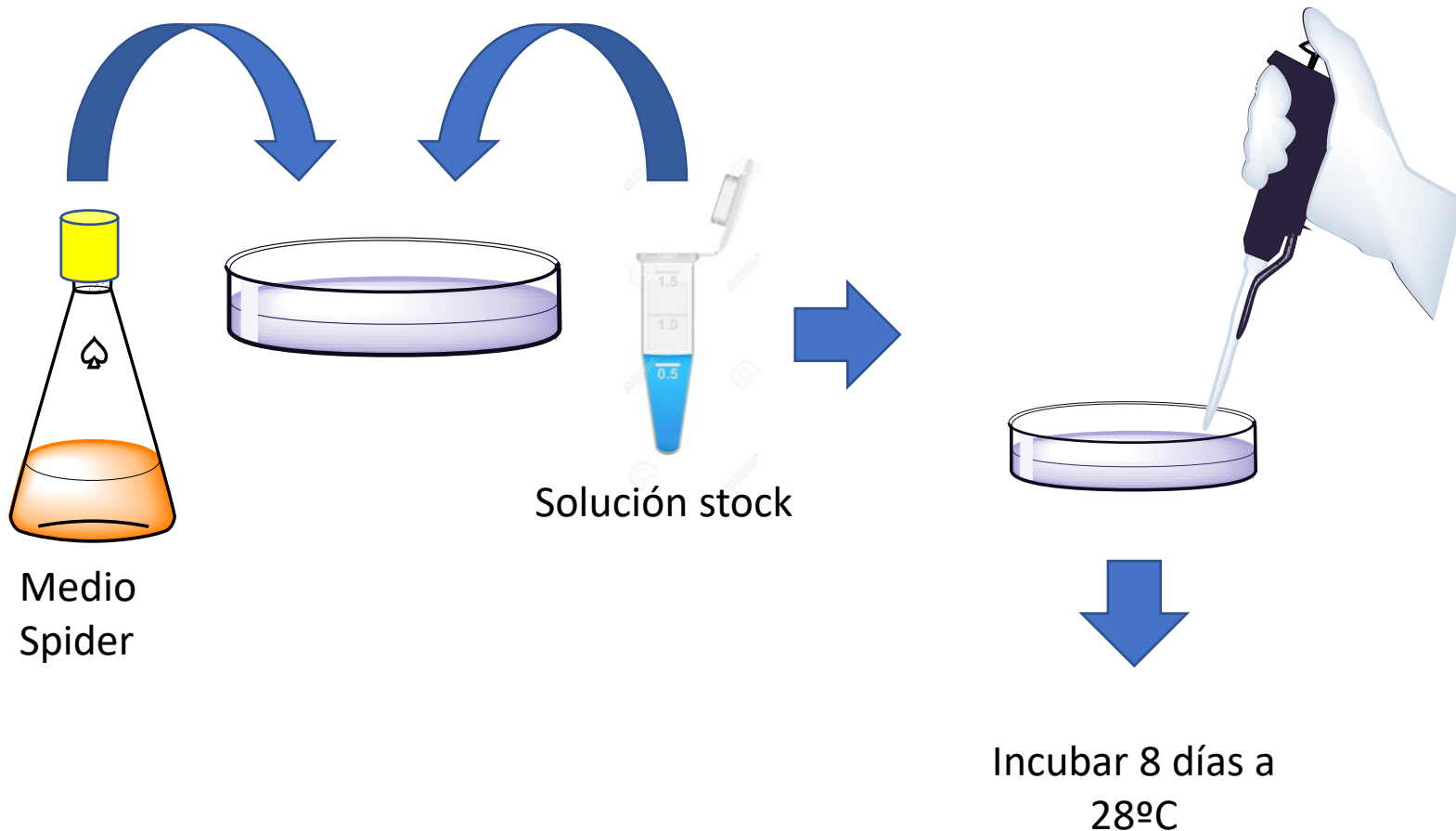
Inhibición de la adherencia a células epiteliales bucales



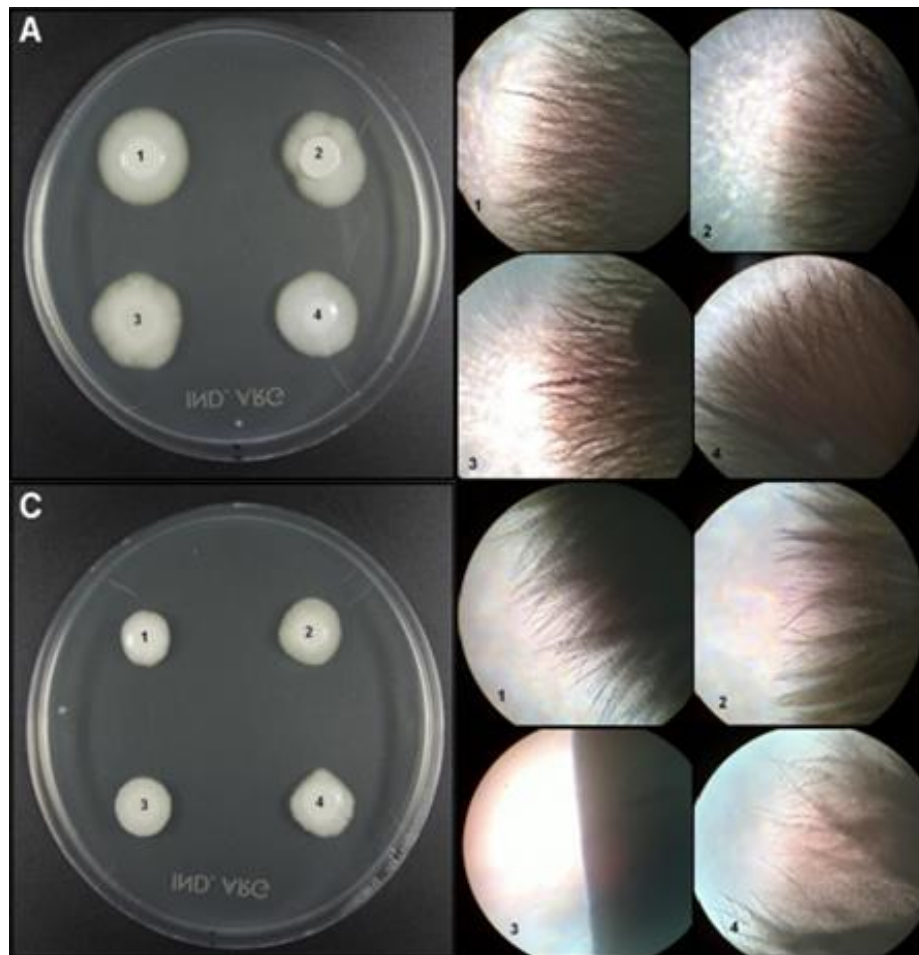
célula	Levaduras
1	14
2	16
3	13
4	15
5	18
6	11
7	12
8	19
9	14
10	13
11	16
12	18
...	...



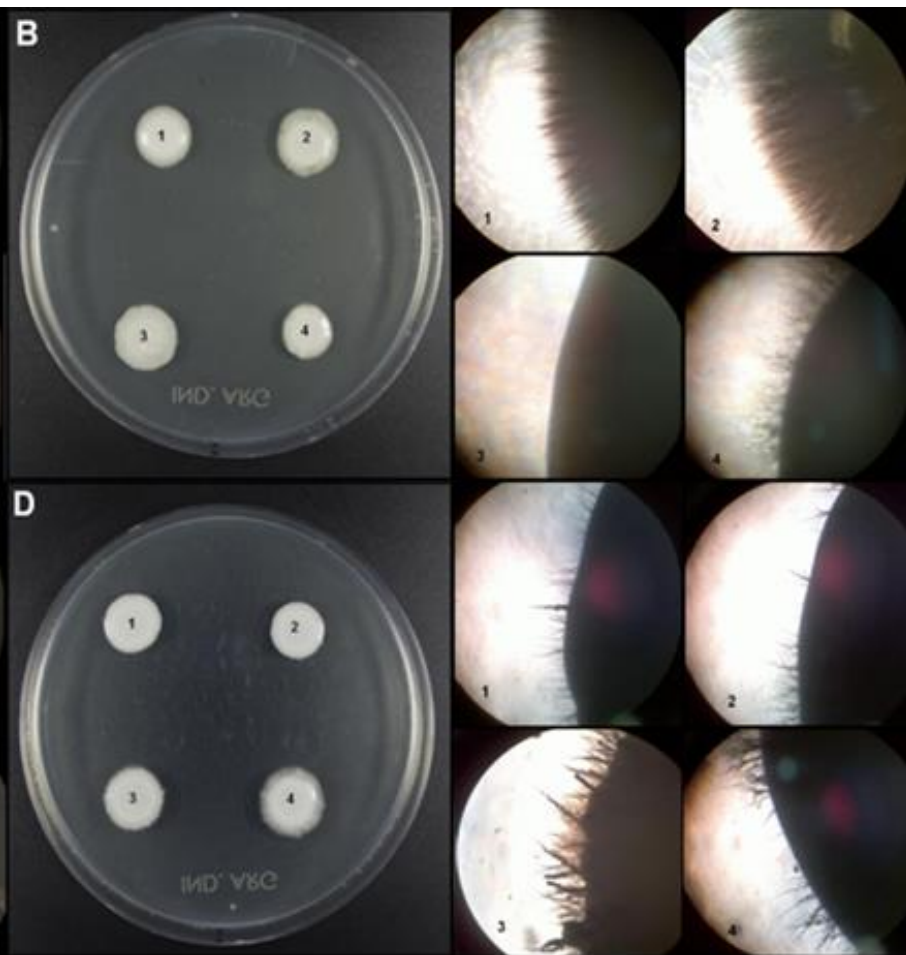
Inhibición de la formación de pseudomicelio



Control



Tratamiento 1

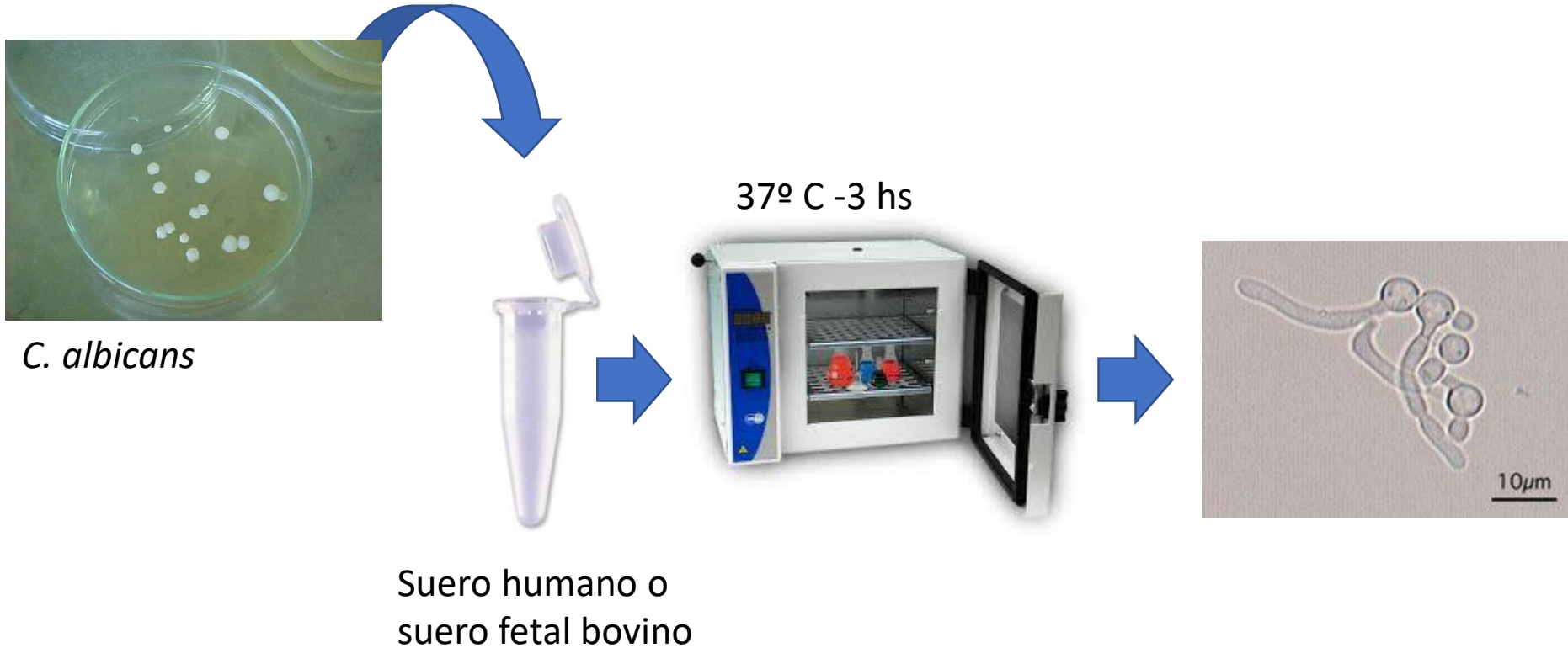


Tratamiento 2

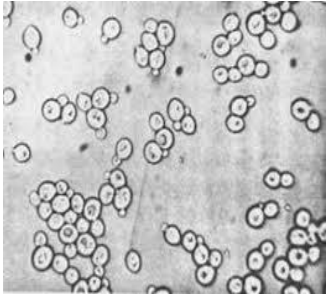
Tratamiento 3

Inhibición de la formación de tubo germinativo

- Formación de tubo germinativo



Inhibición de la formación de tubo germinativo



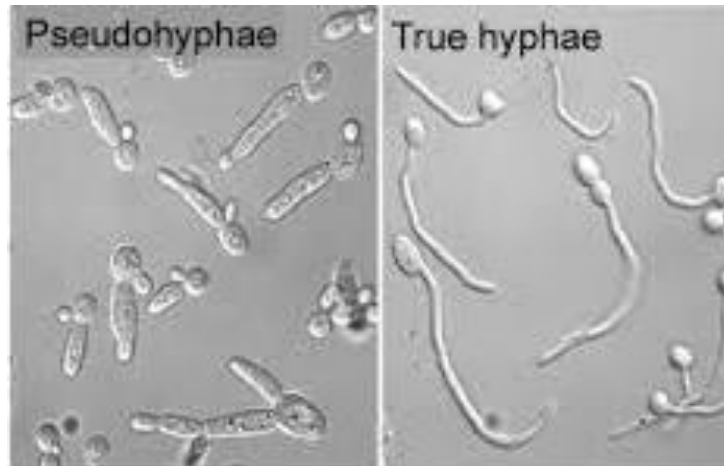
C. albicans



37° C -3 hs

Suero
humano

Solución de
trabajo



Inhibición de la secreción de enzimas líticas

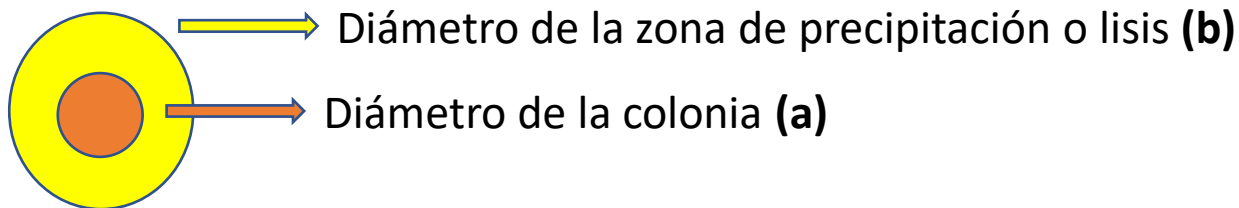
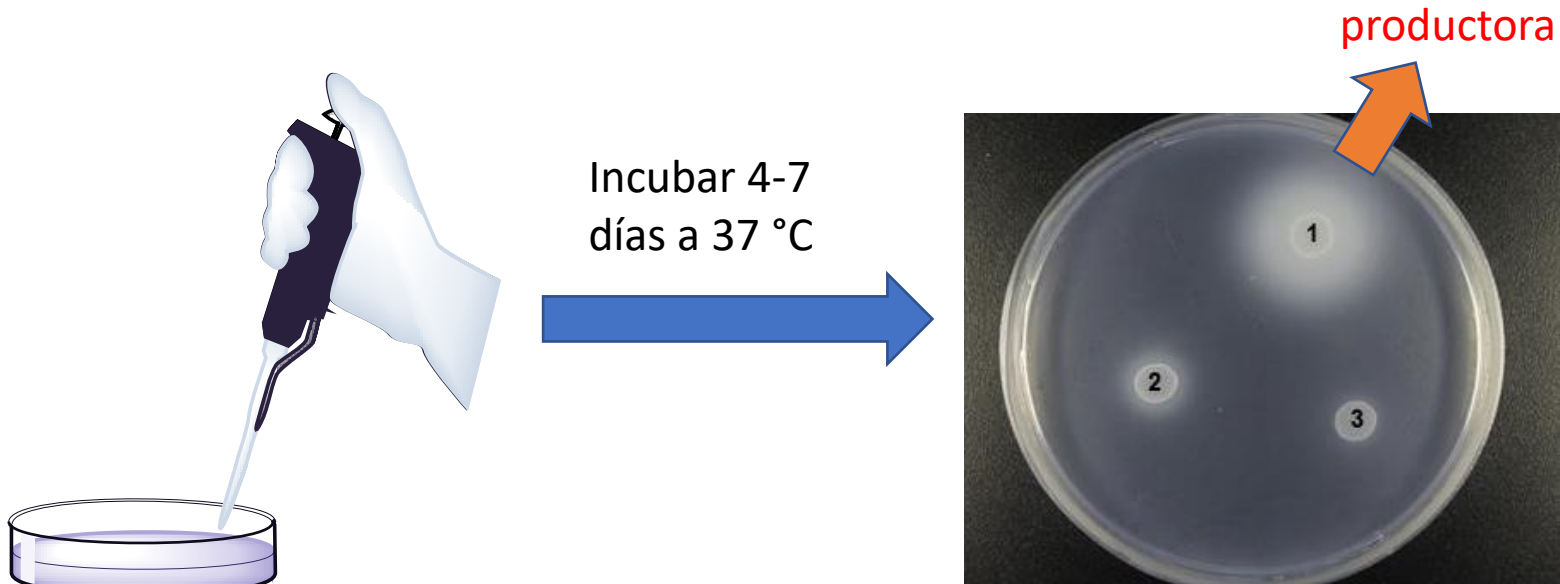
- Preparación de medios de cultivo

Medio	fosfolipasas	proteinasas	hemolisinas	esterasas
Componentes termoestables	peptona (1%), glucosa (3%), NaCl (1 M), CaCl ₂ (5 mM) y agar (1.5 %)	KH ₂ PO ₄ (0.1 %), MgSO ₄ (0.5 %), 1 glucosa (1%) y agar (1.5 %)	peptona (1%), glucosa (3%) y agar (1.5 %)	peptona (1%), NaCl (0.5 %), CaCl ₂ (0.01 %) y agar (1.5 %).
Componentes termolábiles	8% v/v de yema de huevo estéril	2% Albúmina sérica bovina	7% de sangre	0.5 % v/v de Tween 80



Inhibición de la secreción de enzimas líticas

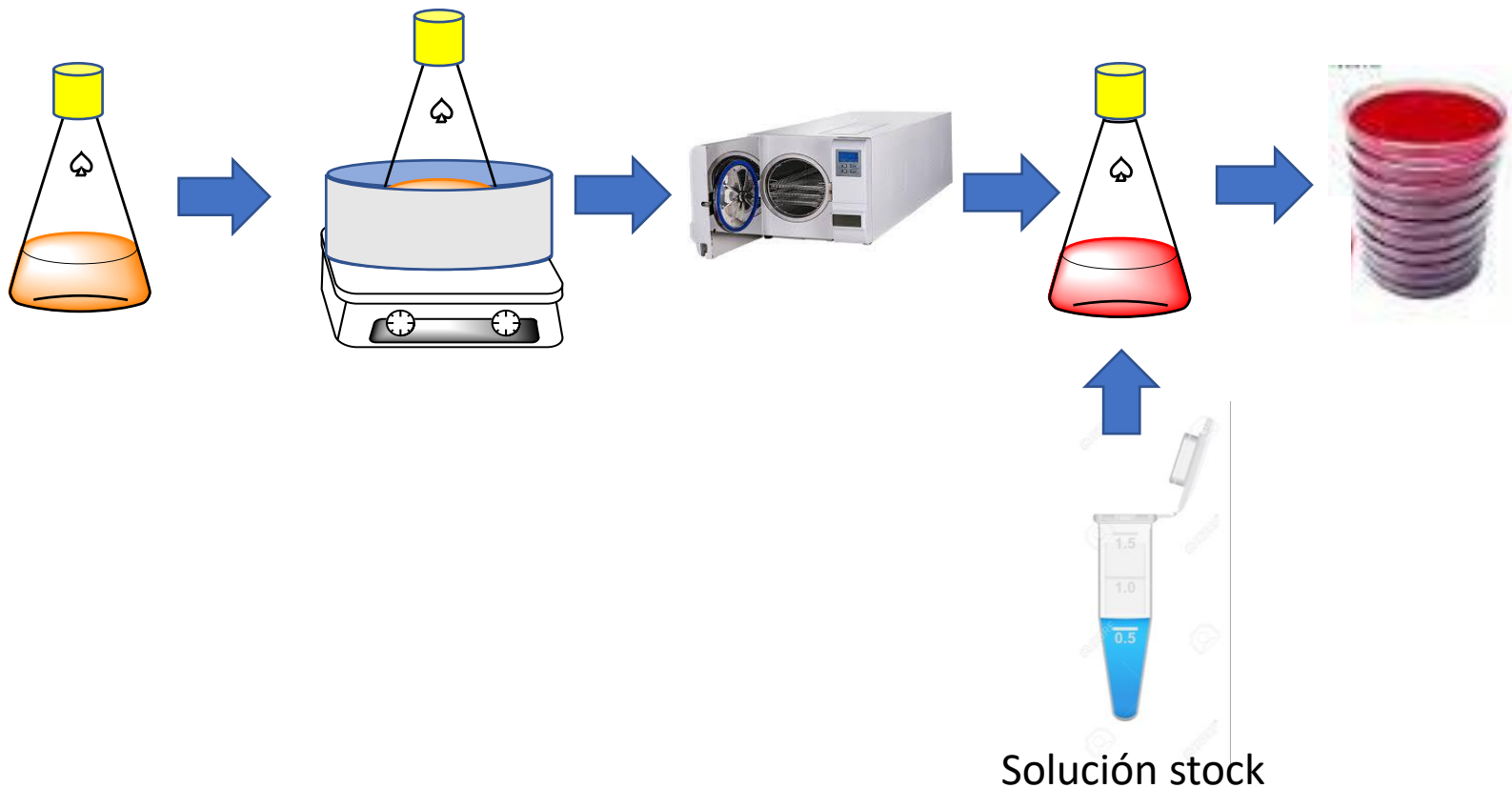
- Evaluación de la capacidad secretora



$$Pz=a/b$$

Inhibición de la secreción de enzimas líticas

- Evaluación de la inhibición de la capacidad secretora



Modelos *in vivo*

- *Galleria melonella*



Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay

Julia Breger¹, Beth Burgwyn Fuchs¹, George Aperis¹, Terence I. Moy², Frederick M. Ausubel^{2,3}, Eleftherios Mylonakis^{1*}

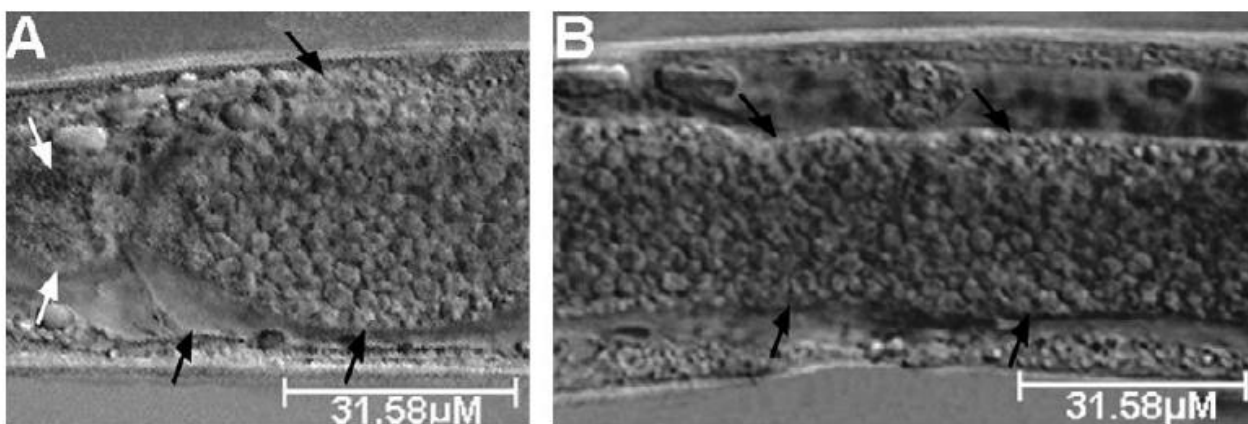


Figure 2. Intact *C. albicans* Cells Persist within the *C. elegans* Intestine

C. elegans strain *glp-4;sek-1* L4 worms were transferred from OP50 to *C. albicans* for 30 min and then moved to *Candida*-free liquid media for 6 d when the worms were photographed. Intact yeast cells are seen within the (A) proximal and (B) distal intestine. White arrows in (A) point to the pharyngeal grinder organ. Black arrows point to the intestinal lumen. Scale bars are 31.58 μm.

doi:10.1371/journal.ppat.0030018.g002

Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay

Julia Breger¹, Beth Burgwyn Fuchs¹, George Aperis¹, Terence I. Moy², Frederick M. Ausubel^{2,3}, Eleftherios Mylonakis^{1*}

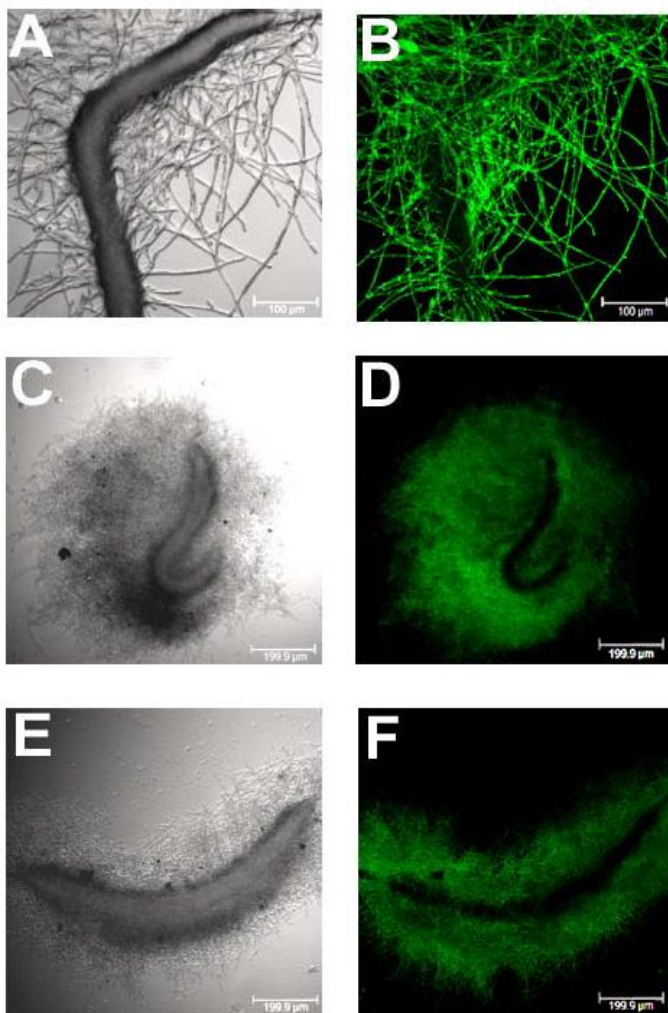


Figure 4. Progression of Filamentation

The images show *C. elegans glp-4;sek-1* nematodes infected by *C. albicans* strain DAY185 for 2 h and then moved into pathogen-free liquid media. On day 1, dead worms were moved to fresh wells containing liquid media and allowed to incubate until day 6 (A and B), or day 8 (C–F). (A, C, and E) are the light-field images and (B, D, and F) are fluorescent images that show the filaments stained with Concanavalin A-Alexafluor, which binds to polysaccharides. Scale bars are 100 μm (A and B) and 199.9 μm (C–F).

doi:10.1371/journal.ppat.0030018.g004

Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay

Julia Breger¹, Beth Burgwyn Fuchs¹, George Aperis¹, Terence I. Moy², Frederick M. Ausubel^{2,3}, Eleftherios Mylonakis^{1*}

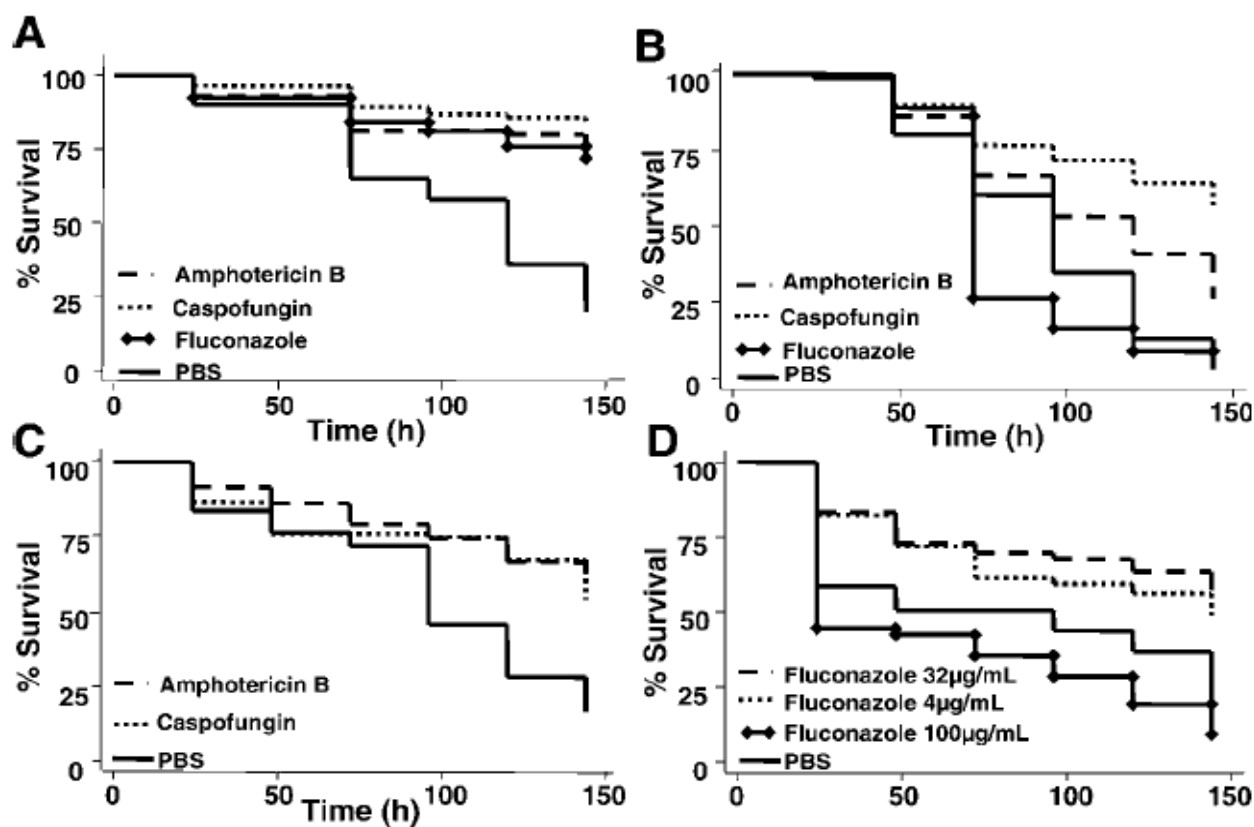
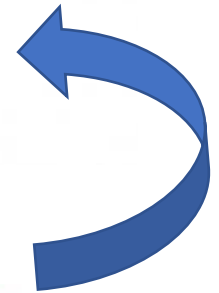


Figure 6. Antifungals Prolong the Survival of *C. elegans glp-4;sek-1* Nematodes Infected by *Candida* spp. and Evaluation of Antifungals in the *C. elegans* Assay Allows the Concomitant Evaluation of Toxicity

Actividad antifúngica sobre biofilms

Evaluación de la capacidad de formación de biofilm

- Preparación del inóculo



20ml de YPD
overnight -150-180 rpm - 30° C.



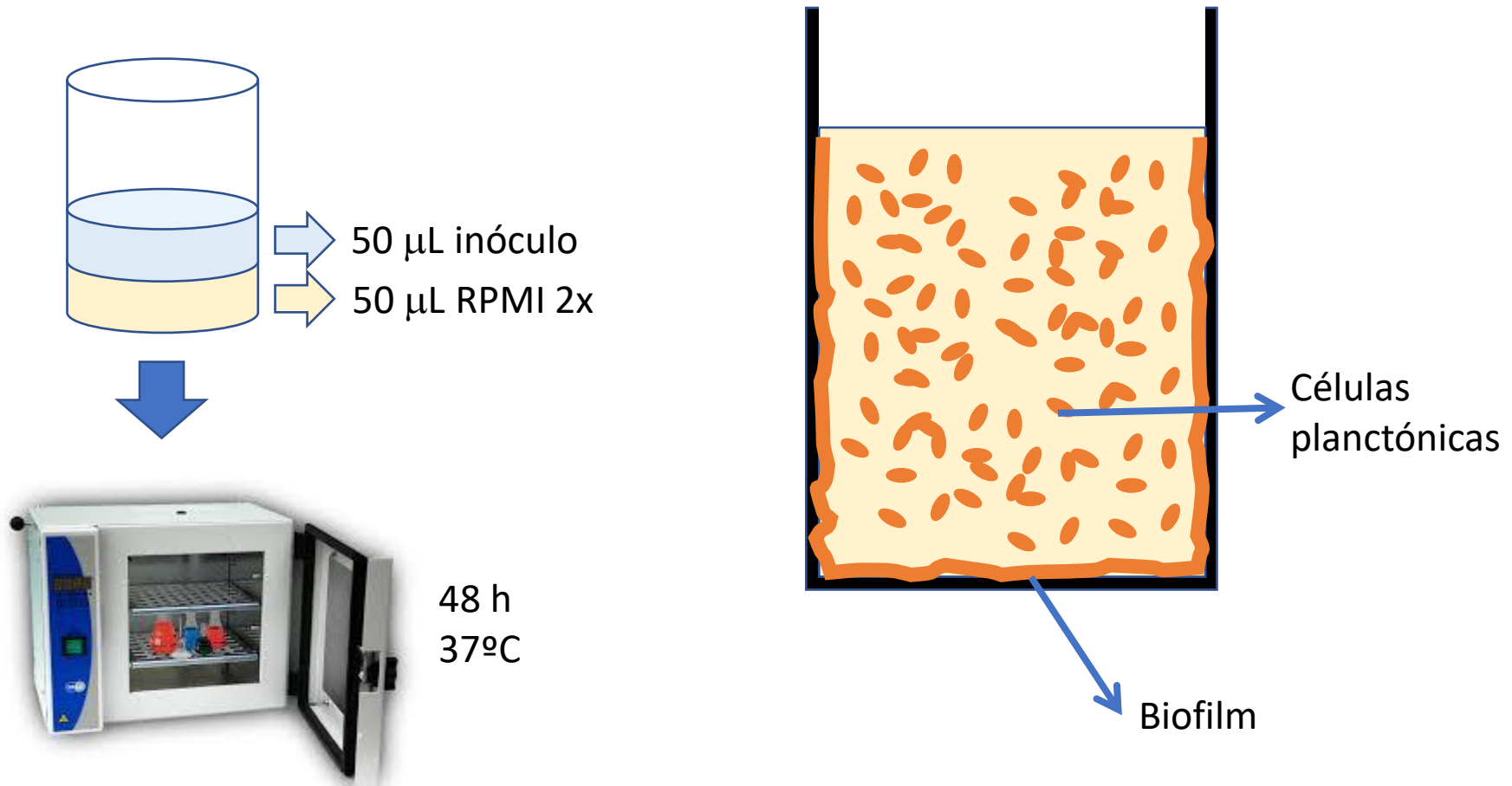
3000g - 5 min
20 ml de PBS



1.0×10^6 células/ml

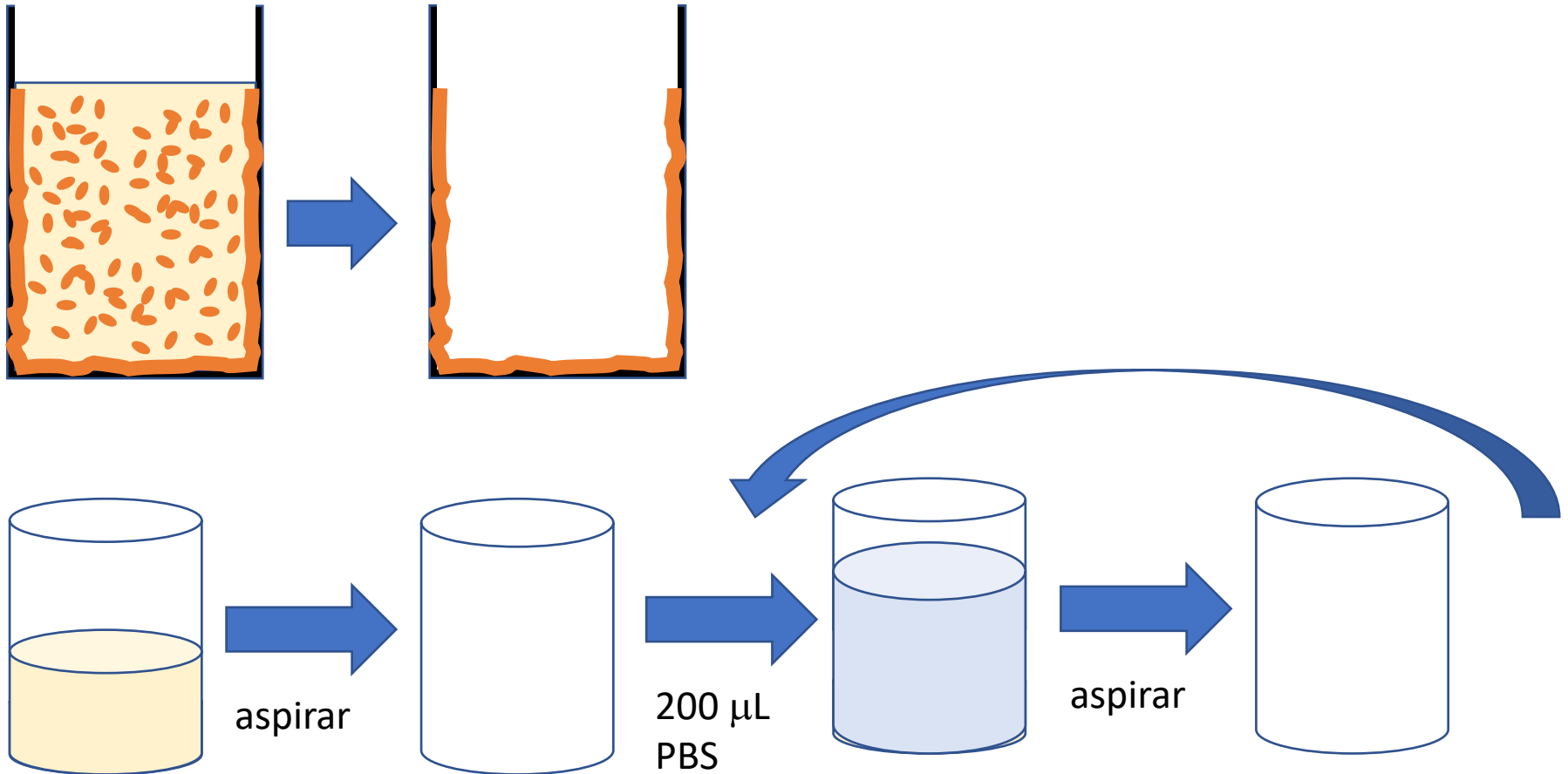
Evaluación de la capacidad de formación de biofilm

- Ensayo



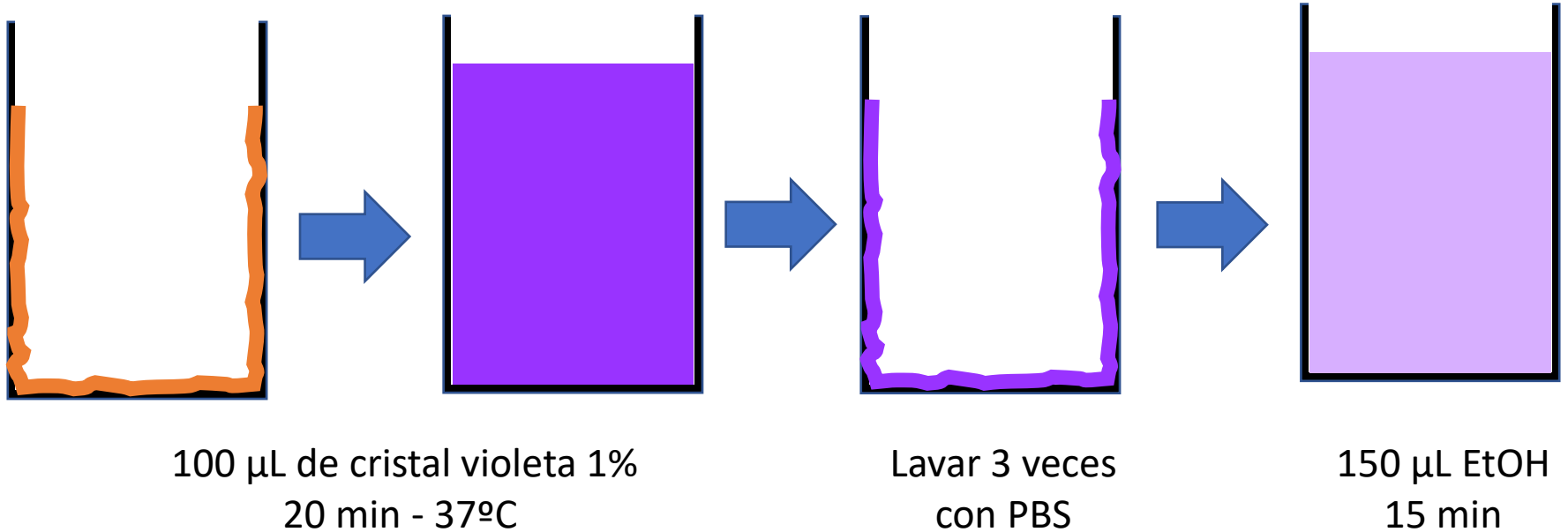
Evaluación de la capacidad de formación de biofilm

- Lavados



Evaluación de la capacidad de formación de biofilm

- Tinción



Formadora
fuerte



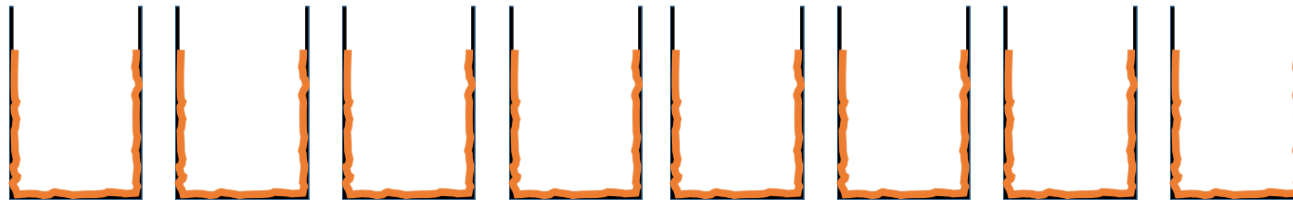
Formadora
débil



No
formadora

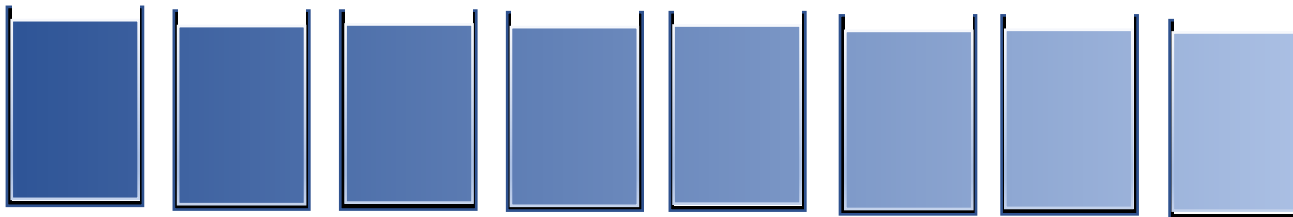
Evaluación de la actividad antifúngica sobre biofilm

- 1 – generar biofilm en los pocillos de la microplaca

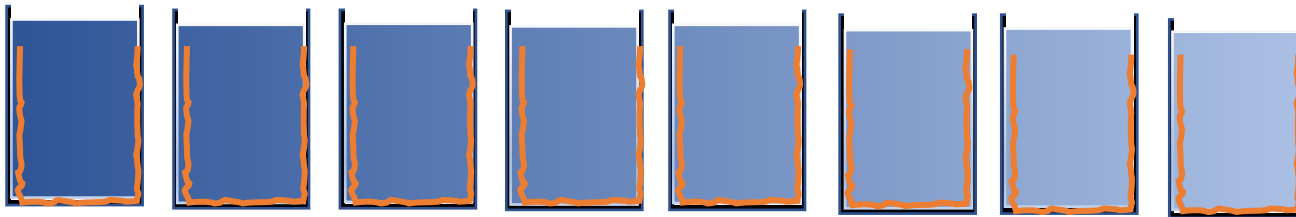
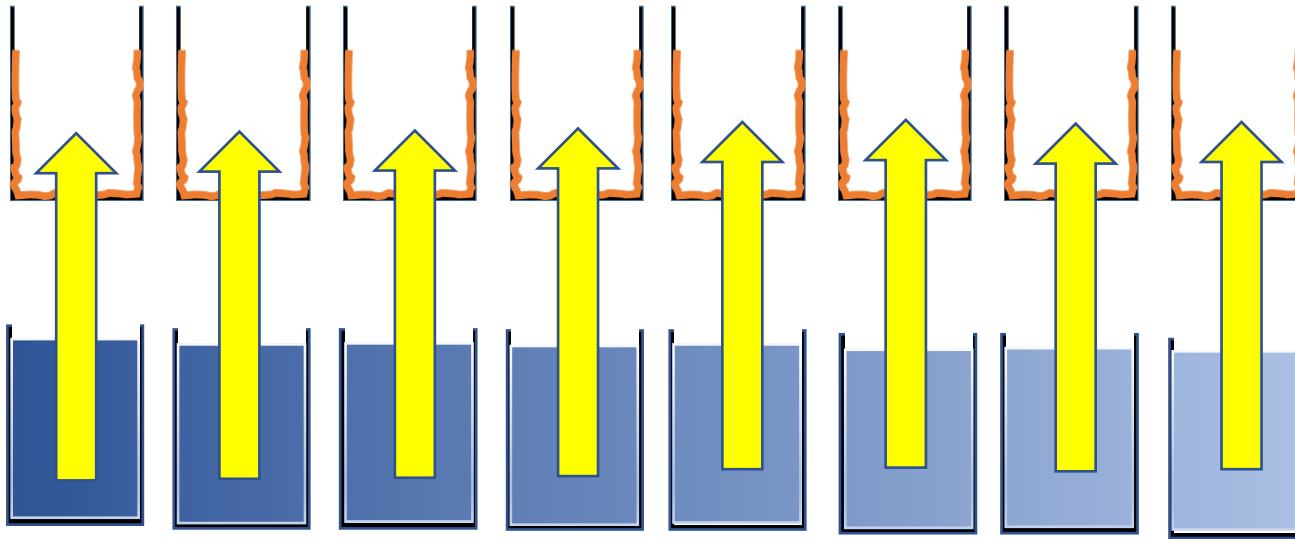


50 μ L inóculo
50 μ L RPMI 2x
48 h -37°C
Lavar con PBS

- 2 – en otra microplaca, realizar diluciones sucesivas del antifúngico

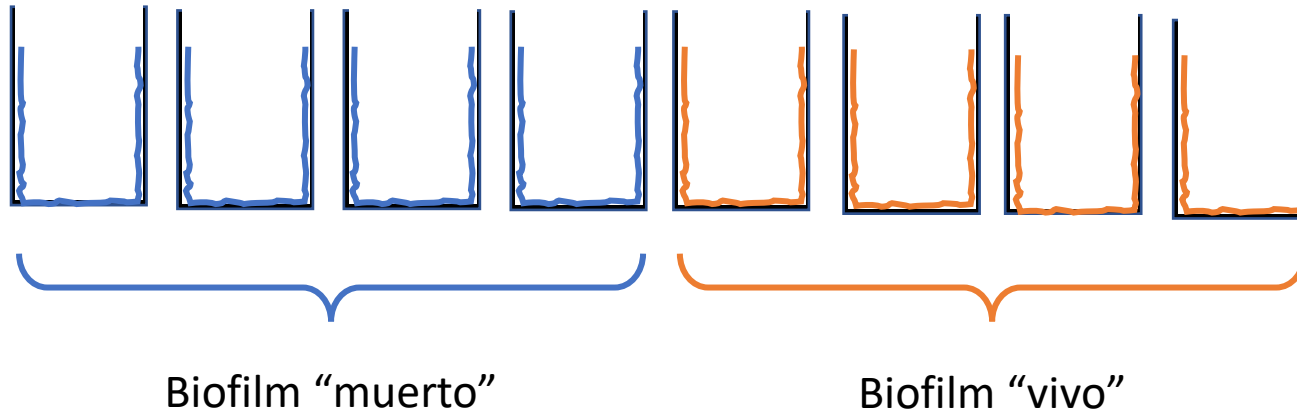


Evaluación de la actividad antifúngica sobre biofilm

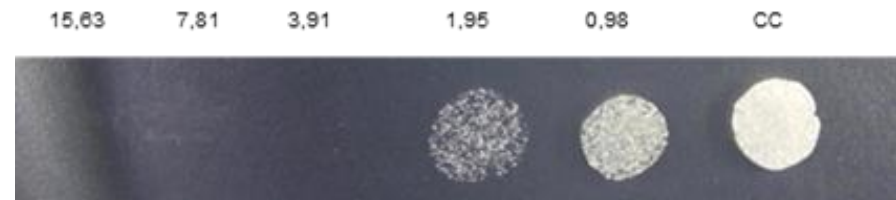


48 h
37°C

Evaluación de la actividad antifúngica sobre biofilm



- No se puede utilizar cristal violeta
- La viabilidad se puede evaluar por
 - Cuantificación de UFC/mL



- Utilización de coloración vital (MTT, XTT)



Bibliografía

A method for the formation of *Candida* biofilm in 96 well microtiter plates and its application to antifungal susceptibility testing

Chrisopher Pierde, Priya Uppuluri, Jose Lpez-Ribot

En. V.K. Gupta et al. (eds). **Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology**, Fungal Biology,

DOI 10.1007/978-1-4614-2356_16. Springer