

# Presente y futuro de la micología médica

Juan Luis Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, Emilia Mellado y Araceli Monzón

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

En la segunda mitad del siglo xx, la prevalencia de las infecciones fúngicas ha aumentado de forma constante, debido al mayor número de pacientes inmunodeprimidos y a la generalización de agresivas prácticas diagnósticas y terapéuticas. Desde 1970, la incidencia anual de la candidosis y aspergilosis invasora ha aumentado 40 y 6,5 veces, respectivamente. Otros estudios publicados en Estados Unidos y Europa, señalan que *Candida* spp. se ha situado entre los microorganismos aislados con más frecuencia en hemocultivos; constituyendo entre el 5-10% de las sepsis nosocomiales. En esta revisión se analiza la situación actual de la micología médica, en la que es indudable que el diagnóstico y tratamiento de la infección fúngica invasora es lo que más preocupa al colectivo que se enfrenta a este tipo de pacientes. Para ello, se ha examinado lo que ha representado el aumento de la incidencia de este tipo de infecciones, la problemática que supone el diagnóstico mediante técnicas microbiológicas convencionales, detección de antígenos y anticuerpos y otras basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Por último, las incertidumbres que genera el tratamiento con la llegada de nuevas formulaciones y antifúngicos también se intenta situar en el contexto actual. El futuro de la micología médica depende de muchos factores y, entre ellos, la biología molecular será el eje central. Sin embargo, el desarrollo será más lento que en otras ramas de la Microbiología como la virología y la bacteriología. Lo que no se puede olvidar es que aunque el aumento de la incidencia ha sido espectacular ningún grupo conseguirá en solitario realizar estudios que contesten a las innumerables preguntas que quedan por responder. La iniciativa realizada por la Subdirección General de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III con la convocatoria para financiar Redes Temáticas de Investigación Cooperativa puede ser el punto de partida para conseguir disminuir la morbilidad y la mortalidad de este grupo de pacientes.

**Palabras clave:** Micología médica. Infección fúngica invasora. *Candida*. *Aspergillus*. Diagnóstico. Tratamiento. Sensibilidad a los antifúngicos.

The present and future of medical mycology

During the second part of xx century, the prevalence of fungal infections has raised inexorably. The main cause has been the increase of number of immunosuppressed patients and the new aggressive therapeutic approaches. Since 1970, the annual incidence of candidosis and aspergilosis has increased 40 and 6.5 times, respectively. Additional studies reported in USA and Europe indicated that *Candida* produce between 5-10% of all episodes of nosocomial sepsis. In this revision, we analyse the present situation of Medical Mycology including the most relevant aspects as: a) the increase of incidence in fungal infections; b) the problems of the diagnosis including classical and new methodologies and antifungal susceptibility testing, and c) the uncertainties of the treatment due to the arrival of new formulations and new antifungals

The future of Medical Mycology depends in many factors but molecular biology will play the central role although this discipline will develop slower than other microbiology areas as virology or bacteriology. Although the increase of incidence in invasive fungal infections has been enormous, we must not forget that any group in solitary could not answer the many unresolved questions. Thus, the call for research executed by Instituto de Salud Carlos III for financing Thematic Research Networks could be the starting point for a new time in invasive fungal infections.

**Key words:** Medical mycology. Invasive fungal infections. *Candida*. *Aspergillus*. Diagnosis. Treatment. Susceptibility to antifungals.

## Presente de la micología médica

### Aumento de la incidencia

En la segunda mitad del siglo xx, la prevalencia de las infecciones fúngicas ha aumentado constantemente, debido al mayor número de pacientes inmunodeprimidos y a la generalización de agresivas prácticas diagnósticas y terapéuticas<sup>1</sup>. Desde 1970, la incidencia anual de la candidosis y aspergilosis invasora ha aumentado 40 y 6,5 veces respectivamente<sup>2,3</sup>. Otros estudios publicados en Estados Unidos y Europa señalan que *Candida* spp. se ha situado entre los microorganismos aislados con más frecuencia en hemocultivos<sup>4</sup>; y constituyen entre el 5-10% de las sepsis nosocomiales<sup>5</sup>. La candidemia prolonga en 3 semanas la estancia hospitalaria media de los enfermos y multiplica por dos el riesgo de muerte durante el ingreso<sup>3</sup>. Asimismo, el 17% de los enfermos ingresados en unidades de cuidados intensivos tienen cultivos positivos para alguna

Correspondencia: Dr. J.L. Rodríguez-Tudela.  
Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III.  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2. 28220 Madrid. España.  
Correo electrónico: juanl.rodriguez-tudela@isciii.es

especie de levadura, siendo cada vez más frecuente el aislamiento de especies distintas de *C. albicans* como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, etc.<sup>6</sup>.

La información sobre las infecciones causadas por hongos filamentosos es más escasa. Los hongos miceliales que con más frecuencia causan infecciones pertenecen al género *Aspergillus*<sup>7</sup>, aunque en los últimos años se está detectando un notable aumento en la incidencia de infecciones por otros géneros como *Fusarium*, *Scedosporium* y *Acremonium*.

En todo el mundo se realizan algo más de 650.000 trasplantes al año, con un incremento anual del 1,5%. España mantiene un costoso programa de trasplantes, que ha situado a nuestro país entre los estados que realizan un mayor número de injertos al año. Las micosis invasoras son una de las principales complicaciones que pueden aparecer en enfermos trasplantados. Se calcula que el 10-15% de estos pacientes desarrollarán una infección por levaduras. Asimismo, el 15-20% de los trasplantados de médula ósea o de algún órgano sólido, principalmente de pulmón, tendrán una infección invasora por *Aspergillus*<sup>7,8</sup>.

En consonancia con lo anterior, en la última década el consumo de antifúngicos ha aumentado el 12% al año y según datos de la Agencia Europea del Medicamento, el coste anual mundial en antifúngicos asciende a 3.600 millones de euros; un tercio del mismo corresponde al gasto europeo. En paralelo, se está detectando un porcentaje creciente de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a estos antimicrobianos<sup>3</sup>. Además, se empieza a sospechar que el uso indiscriminado de algunos antifúngicos como el fluconazol o el itraconazol en tratamientos empíricos y en profilaxis está ocasionando cambios ecológicos, que se traducen en un desplazamiento de las especies sensibles por otras con resistencias intrínsecas a éstos. Cada año se describen nuevas especies patógenas y cada vez son más frecuentes las infecciones invasoras por hongos que muestran resistencia *in vitro* a los antifúngicos y que hasta hace poco tiempo se consideraban no patógenos o que sólo originaban infecciones superficiales (*Dipodascus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Scopulariopsis*, *Cladophialophora*, etc.)<sup>8,9</sup>.

La mortalidad asociada a las infecciones fúngicas es muy elevada. Así, la mortalidad atribuible a la candidemia es del 35-40%, y a la aspergilosis invasora del 85%<sup>1,8</sup>.

## La problemática del diagnóstico

La principal característica de la mayoría de las infecciones fúngicas invasoras es que están causadas por microorganismos oportunistas. Además, muchos de ellos pueden colonizar a los pacientes sin causar enfermedad. Éstos y otros factores mantienen la incertidumbre y la controversia sobre cuáles son los métodos más adecuados para diagnosticar estas infecciones. Una dificultad añadida es la disparidad de criterios en la definición de la infección fúngica invasora y, así, durante los últimos años se está realizando un esfuerzo considerable para alcanzar un consenso. En el año 2002, miembros del Invasive Fungal Infections Cooperative Group de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (IFIG/EORTC) y del Infectious Diseases Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases alcanzaron un acuerdo sobre las definiciones de la infección fúngica

invasora que ha supuesto un avance considerable en este campo<sup>10</sup>, ya que sin la estandarización de las definiciones no puede conseguirse una adecuada interpretación y una comparación fiable de las diferentes aproximaciones diagnósticas y terapéuticas. Por otro lado, un factor muy importante en el diagnóstico de la infección fúngica invasora es la prevalencia o la incidencia de la infección en el grupo de pacientes estudiado. Así, el valor predictivo positivo de una técnica diagnóstica como la detección del antígeno galactomanano mediante *Platelia aspergillus*<sup>®</sup> (Biorad, Madrid, España) es del 10% cuando la incidencia de aspergilosis invasora es del 0,5%. Por el contrario, cuando la incidencia es del 20%, el valor predictivo positivo asciende al 84%<sup>11</sup>. En resumen, la identificación de los factores de riesgo y su estratificación es esencial para un empleo adecuado de las técnicas diagnósticas.

En general, los métodos convencionales de laboratorio son similares a los empleados en bacteriología y se basan en el examen directo de las muestras mediante microscopía óptica y su cultivo. Los medios de cultivo utilizados son los habituales, pero deben utilizarse medios específicos para hongos y medios selectivos cuando la infección sea polimicrobiana o la muestra pueda contener flora bacteriana comensal. Un tema esencial y que debe ser asumido por todos los laboratorios de microbiología es la identificación de las levaduras y hongos filamentosos al nivel de especie. Las razones van más allá del mero hecho académico. Así, es conocida la diferente susceptibilidad a los antifúngicos de las distintas especies de *Candida* y, sin duda, es previsible que algo parecido ocurra entre las diferentes especies de hongos filamentosos. Así por ejemplo, existen datos sobre la susceptibilidad disminuida de *Aspergillus terreus* a anfotericina B, cuando se compara con la de *A. fumigatus*<sup>12-16</sup>. *Scedosporium apiospermum* es sensible a varios antifúngicos mientras que la infección por *S. prolificans* es prácticamente intratable<sup>17-19</sup>. La identificación al nivel de especie de la mayoría de las levaduras que se aíslan de la práctica clínica está al alcance de la mayoría de los laboratorios asistenciales. En el caso de los hongos filamentosos la identificación puede ser más complicada y en bastantes casos puede requerir el concurso de un centro de referencia. Otro aspecto importante es la utilización de medios de cultivo diferenciales que permiten la identificación de muestras que contienen levaduras de diferentes especies. Normalmente se emplean medios diferenciales cromogénicos que permiten distinguir especies de levaduras por el color de la colonia. Estos medios son de gran utilidad para distinguir las infecciones mixtas por dos o más especies de levaduras, micosis que según algunos datos son más habituales de lo que se cree.

En relación con las técnicas indirectas que están disponibles comercialmente hay que indicar que la situación es bastante confusa, aunque en algunos aspectos puntuales se ha avanzado alcanzándose conclusiones relevantes. El diagnóstico de la criptococosis invasora mediante la detección de antígeno capsular es una técnica suficientemente conocida con una sensibilidad y especificidad excelente. Con respecto al diagnóstico de la candidosis invasora mediante detección de antígenos y/o anticuerpos hay que señalar que se deben realizar más estudios en los que se estratifique por factores de riesgo, tipo de enfermo y cuadro clínico.

En relación con la aspergilosis invasora, la detección de galactomanano (Platelia Aspergillus®, Biorad, España) tiene su máxima utilidad en pacientes oncohematológicos, considerados de alto riesgo de sufrir la infección<sup>20-22</sup>. Además existen datos de que esta prueba es útil para el seguimiento de la respuesta<sup>23</sup>. Para otros grupos de pacientes, esta técnica puede ser de utilidad, pero por el momento no existen estudios fiables que lo demuestren.

Existe otra técnica comercial, denominada Fungitec G test o Glucatell (Seikagaku Kogyo Corporation y Wako WB003 test, Wako Pure Chemical Industries) que no ha sido evaluada mediante estudios multicéntricos estratificados, y aunque parece prometedora, no se puede recomendar hasta conocer más estudios de evaluación<sup>24,25</sup>.

En cuanto a las técnicas diagnósticas basadas en la detección de ácidos nucleicos, se han aplicado varios métodos en los últimos años para mejorar el diagnóstico de las micosis. Ninguna de ellas ha logrado superar la fiabilidad de los métodos tradicionales y apenas tienen aplicabilidad asistencial. Se han evaluado técnicas "caseras" para detectar ácidos nucleicos de levaduras y hongos miceliales. Habitualmente, se han amplificado las regiones ITS (*Internal Transcriber Spacer*), del ADNr llegándose a detectar cantidades muy pequeñas de ADN (10 pg). Sin embargo, la limitación de estas técnicas no es la sensibilidad sino la especificidad, que se sitúa alrededor del 70%<sup>26-36</sup>.

## La situación de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y estudios de correlación

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de la resistencia *in vitro*, que tienen cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por otra parte, prácticas terapéuticas como el uso de la profilaxis antifúngica y de los tratamientos empíricos han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de hongos que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca. Por eso parece cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. Además, desde la aparición de nuevas moléculas antifúngicas y de nuevas estrategias terapéuticas, la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica u otra<sup>37-39</sup>.

Existen varios métodos estandarizados para detectar resistencias *in vitro* en levaduras. El más conocido y difundido es el recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, documento M27HA2). Este método incluye técnicas de macrodilución y microdilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), entre cuyas principales características se incluyen un procedimiento espectrofotométrico para la preparación del inóculo, el medio RPMI a pH 7,0 como medio de cultivo, la lectura visual de los tubos o de las placas, el cálculo de la CIM por porcentajes o gradación de la inhibición y recomendaciones para controlar la calidad de los resultados<sup>40</sup>.

El documento M27HA2 se ha convertido en el método de referencia para los estudios de sensibilidad en levaduras y, así, otras técnicas normalizadas desarrolladas en los últimos años se han basado en este estándar, por lo que algunos

autores las denominan como NCCLS-like<sup>38</sup>. Este es el caso del método propuesto por el European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas<sup>41</sup>. El estándar del EUCAST propone algunas modificaciones para determinar la CIM de las levaduras, acortando el período de incubación necesario para obtener la CIM (de 48 a 24 h) y prescindiendo de la subjetividad de la lectura visual para calcular los porcentajes de inhibición. Las CIM obtenidas mediante el método del EUCAST muestran una elevada correlación con las obtenidas por el NCCLS (> 85%), por lo que este método puede constituir una alternativa semiautomatizada para realizar estudios de sensibilidad<sup>42</sup>.

En lo que se refiere a los hongos miceliales, el NCCLS también ha aprobado recientemente un método para realizar estudios de sensibilidad en hongos productores de conidias (documento M38-A)<sup>43</sup>. En términos generales debe indicarse que los estudios de sensibilidad en hongos miceliales se encuentran más retrasados que los de las levaduras. Además, este estándar se ha desarrollado para unas pocas especies de hongos y algunos expertos cuestionan si el medio de cultivo es el idóneo, así como el procedimiento de preparación del inóculo.

Los métodos para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos en levaduras y hongos muestran una serie de limitaciones técnicas entre las que destacan las siguientes:

1. Dificultades para detectar la resistencia a la anfotericina B.
2. Crecimiento residual descrito con fármaco fungistáticos como los azoles y la fluorocitosina.
3. Problemas de crecimiento en determinadas especies como *C. neoformans* y otras levaduras<sup>38-44</sup>.

A pesar de todos estos problemas se han desarrollado una buena cantidad de técnicas comerciales que intentan simplificar los métodos de detección de resistencias. De todas ellas, sólo una minoría ha demostrado una buena concordancia con los resultados de los métodos de referencia. Entre éstas destacan dos técnicas comerciales basadas en la microdilución marcada con contrastes colorimétricos, el Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic Systems) y el ASTY (ASTY Inc). Estos dos métodos muestran una buena concordancia con los resultados obtenidos mediante los estándares del NCCLS y pueden constituir una alternativa para los laboratorios asistenciales<sup>38,39,45</sup>. Otra técnica comercial que muestra una buena correlación con los estándares es el Etest (AB biodisk), un método basado en la difusión que ha sido ampliamente evaluado tanto para levaduras como para hongos miceliales. La mayoría de los trabajos publicados ha demostrado una correlación aceptable con los procedimientos NCCLS o NCCLS-like, aunque se ha observado una concordancia cercana al 50%, en algunas especies de *Candida*, en *C. neoformans* y en levaduras poco frecuentes en la práctica clínica<sup>46-52</sup>. Algunos expertos creen que tanto los métodos colorimétricos como los de difusión en agar no deben emplearse en laboratorios asistenciales, hasta que se superen los problemas que tienen las técnicas de referencia. No obstante, es indiscutible que estas técnicas son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a los azoles, lo que les puede otorgar un papel a la hora de realizar recomendaciones terapéuticas. No obstante, no

debe olvidarse que las técnicas de sensibilidad a los antifúngicos muestran una discreta correlación *in vitro-in vivo*, correlación que es aun más baja en el caso de las micosis invasoras<sup>38-44</sup>.

Por último, queda por revisar cuándo se deben realizar estos estudios. En primer lugar, hay que indicar que no existen recomendaciones estrictas y que las mismas están basadas en opiniones de expertos, conferencias de consenso y en algunos casos existen estudios controlados con un tamaño de muestra pequeño.

Existen algunas situaciones en las que las pruebas de sensibilidad han demostrado tener utilidad. Entre éstas cabe destacar los casos en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en los que los enfermos que han recibido profilaxis antifúngica previa y en los casos en las que las cepas pertenezcan a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su espectro de sensibilidad *in vitro*. En estas situaciones el estudio de sensibilidad puede ayudar a elegir el tratamiento más adecuado o, incluso, a variar la estrategia terapéutica específica, aumentando la dosis del antifúngico, cambiando de fármaco o instaurando una terapia combinada<sup>7,38,39,53,54</sup>.

Por otra parte, los estudios epidemiológicos son fundamentales. Varios trabajos han demostrado que la vigilancia epidemiológica de las infecciones fúngicas hospitalarias y ambulatorias puede ayudar a conocer los posibles reservorios, las vías de transmisión y los factores de riesgo de la infección, así como el perfil de sensibilidad de las distintas especies y su incidencia. De esta forma pueden establecerse cuáles son los tratamientos iniciales más adecuados o si debe cambiarse de tratamiento una vez que se ha identificado la especie (sensibilidad predecible). Así, por ejemplo, estudios epidemiológicos españoles han demostrado que el 95% de las cepas causantes de candidemia son sensibles *in vitro* al fluconazol, por lo que este fármaco es una buena opción para el tratamiento inicial de las candidemias<sup>55</sup>.

Por último, pueden realizarse algunas recomendaciones técnicas sobre los estudios de sensibilidad. Como recomendación general debe indicarse que los estudios de sensibilidad tienen que realizarse con un método estandarizado (NCCLS, NCCLS-like o EUCAST). Estos métodos han mostrado una reproducibilidad interlaboratorio elevada y han sido evaluados en estudios de correlación. Debe resaltarse que estas técnicas deberían realizarse en instituciones sanitarias que las hicieran de manera sistemática, siguiendo un sistema estricto de control de calidad de los resultados. Por otro lado, los métodos comerciales pueden ser una alternativa para algunos laboratorios asistenciales, ya que detectan la resistencia a los azoles con bastante fiabilidad. No obstante, no deben emplearse métodos comerciales para los que no existan estudios de correlación con los métodos de referencia o no se haya analizado su reproducibilidad.

## La problemática del tratamiento

Como ya se ha comentado con anterioridad, la mortalidad asociada a las infecciones fúngicas es muy elevada. Así, la mortalidad atribuible a la candidemia es del 35-40%, y a la aspergilosis invasora del 85%<sup>1,8</sup>. Por desgracia, el tratamiento específico de estas infecciones apenas logra

reducir las cifras de mortalidad. Este fracaso terapéutico se debe a un conjunto de factores entre los que destacan las escasas alternativas farmacológicas, la ausencia de técnicas diagnósticas capaces de detectar la infección antes de que haya diseminado, la extrema debilidad de muchos de los enfermos que desarrollan micosis invasoras y la falta de pruebas que puedan predecir con fiabilidad el fracaso terapéutico.

No obstante, debe indicarse que en los últimos años se han producido algunos avances terapéuticos que pueden modificar en breve el pronóstico de algunas de estas infecciones. Entre estos avances destacan la aparición de nuevas moléculas antifúngicas como los nuevos triazoles (voriconazol y posaconazol) y las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina). Asimismo, se han desarrollado nuevas formulaciones de los antifúngicos clásicos como las presentaciones lipídicas de anfotericina B y la formulación parenteral de itraconazol, que parecen aumentar la eficacia y el índice terapéutico de la presentaciones tradicionales. Por último, quizás en los próximos años nuevas estrategias como la terapia combinada y la inmunoterapia sean de gran utilidad en el tratamiento de algunas micosis.

## Futuro de la micología médica

Hace 25 años el desarrollo de la biología molecular parecía que iba a revolucionar las enfermedades infecciosas. Aunque el avance ha sido lento gen tras gen, se han ido dilucidando muchos secretos de los microorganismos. Tras el comienzo de la secuenciación de genomas completos comenzó una nueva revolución. Actualmente se han o se están secuenciando un buen número de microorganismos, de los cuales la mayoría son bacterias patógenas. Entre los hongos se han abordado los siguientes: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Coccidioides immitis*, *Neurospora crassa*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Trichoderma reesei*.

En los próximos años, el conocimiento de la secuencia del genoma de estos hongos aumentará la comprensión de su biología y sus factores de virulencia, y permitirá alcanzar los objetivos que persigue la secuenciación del genoma de un patógeno. Estos objetivos son: a) el desarrollo de vacunas; b) el desarrollo de antimicrobianos, y c) el desarrollo de pruebas diagnósticas. Sin ir más lejos, en el asunto del diagnóstico, las técnicas moleculares cuantitativas pueden ser de una gran utilidad. Una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, que ha mostrado eficacia para el diagnóstico y la detección de resistencias en bacteria y virus, por lo que probablemente pueda constituir una técnica de referencia para el diagnóstico de las micosis en un futuro no muy lejano<sup>56</sup>. Por otro lado, y tomando en consideración el huésped, se está analizando si los factores de virulencia expresados por un patógeno producen una o varias respuestas en el paciente. Así, hoy se sospecha que la cascada de fenómenos que se produce al ponerse en marcha la respuesta inflamatoria y la inmunidad adquirida, incluyendo la secreción de mediadores y la subsiguiente interacción célula-célula, puede dejar una *huella* específica que afecta los procesos de

señales de transcripción genética de las células que participan en esta respuesta. Así, la exposición a un patógeno puede producir una respuesta específica en la expresión de diferentes genes en los leucocitos polimorfonucleares, respuesta persistente y firme, que podría permitir diseñar técnicas de detección para diagnosticar de forma individualizada un proceso infeccioso.

Entre los principios básicos de estos avances, la genómica funcional, comparativa y estructural desempeñan un papel decisivo. Así, mediante la tecnología de *microarrays* se pueden utilizar miles de sondas de ADN individuales, inmovilizadas y perfectamente localizadas en un soporte sólido como una malla de nailon o un porta de cristal. Con ellas, una muestra clínica podrá analizarse para detectar la existencia de un grupo de microorganismos, en este caso hongos, identificarlos al nivel de especie, comparar la variabilidad de algunos genes entre cepas de la misma especie, examinar los mecanismos de resistencia, caracterizarlos a nivel subespecífico, etc.

También se emplearán para monitorizar los cambios en la expresión de genes en diferentes condiciones como las derivadas de la interacción con otras células y moléculas (inmunología y antifúngicos). Asimismo, permitirán medir la expresión de cientos de genes en paralelo. Por ejemplo, la utilización de sondas de ARNm marcadas mediante fluorescencia permitirá ver que genes se expresan en diferentes condiciones. Por otro lado, la información proveniente de la inmunogenética humana permitirá conocer la susceptibilidad individual a diversas infecciones y la farmacogenómica informará de cuál es el antibiótico más adecuado para un paciente en particular.

En conclusión, en los próximos años se asistirá a un buen número de avances en la micología médica que, como es habitual, será menos notable que el observado en el campo de la virología o de la bacteriología. Sin embargo, no puede olvidarse que la mayoría de estas infecciones son oportunistas y que, aunque la incidencia de éstas haya aumentado de forma considerable en los últimos años, no hay ningún centro que por sí solo pueda desarrollar estudios que alcancen conclusiones relevantes. En el momento actual las dos áreas más preocupantes de la micología médica son el diagnóstico y el tratamiento. Con respecto al tratamiento la problemática es grande, pero las empresas farmacéuticas están haciendo un esfuerzo considerable por lo que, en breve, tendremos un buen número de antifúngicos para utilizar en monoterapia o combinados, lo que augura una disminución en la elevada mortalidad que causan estas infecciones. Un tema sin resolver, aunque se están intentando aportar soluciones, es la dificultad para realizar ensayos clínicos aleatorios y a doble ciego que permitan conocer la eficacia real de estas nuevas moléculas y estrategias terapéuticas<sup>37</sup>. El otro problema preocupante es el diagnóstico de la infección fúngica invasora. Varias instituciones sanitarias y compañías de diagnóstico han desarrollado estudios limitados en cuanto a tamaño muestral y representatividad, por lo que, en general, se han alcanzado conclusiones poco valorables. Por tanto, la situación es de confusión y los avances alcanzados son limitados y sólo aplicables en ciertas poblaciones de riesgo. Por otro lado, no debe olvidarse que esta situación puede mejorar con la introducción de nuevas técnicas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos, antígenos y en la

PCR, pero es indudable que también puede aumentar la confusión.

Para finalizar debe destacarse que es necesario que las instituciones sanitarias colaboren en los estudios epidemiológicos y de vigilancia de desarrollo de resistencia a los antifúngicos. Por tanto, la cooperación entre el Sistema Nacional de Salud (SNS) es imprescindible y es la única forma de que, entre todos, se alcancen los resultados pertinentes que permitan lograr una mayor supervivencia y mejorar la calidad de vida de aquellos pacientes que tengan la mala fortuna de adquirir una infección fúngica invasora. En este sentido, la convocatoria para financiar redes temáticas de investigación cooperativa realizada por la Subdirección General de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III ha sido bien recibida y apoyada por el colectivo de profesionales que se dedica a la micología médica ya que, en nuestro ámbito, este programa de investigación puede ser una herramienta esencial para eliminar muchas de las insuficiencias que se han destacado en este artículo.

## Bibliografía

- Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. [A multicenter study on fungemia caused by yeasts in Spain (April-June, 1997). A Work Group to Study Fungemia]. *Rev Clin Esp* 1999; 199:356-61.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29:239-44.
- Baran J Jr, Muckatira B, Khatib R. Candidemia before and during the fluconazole era: Prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand J Infect Dis* 2001;33:137-9.
- Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on Candida species. *Clin Infect Dis* 1995;20:1526-30.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:747-51.
- Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996;100:617-23.
- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781-803.
- Harari S. Current strategies in the treatment of invasive Aspergillus infections in immunocompromised patients. *Drugs* 1999;58:621-31.
- Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22(Suppl 2):S112-S8.
- Ascioglu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7-14.
- Klont RR, Meis JF, Verweij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(Suppl 2):32-7.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1032-7.
- Trachana M, Roilides E, Gompakis N, Kanellopoulou K, Mpantouraki M, Kanakoudi-Tsakalidou F. Case report. Hepatic abscesses due to *Aspergillus terreus* in an immunodeficient child. *Mycoses* 2001;44:415-8.
- Dannaoui E, Borel E, Persat F, Piens MA, Picot S. Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus* in a murine model of disseminated aspergillosis. *J Med Microbiol* 2000;49:601-6.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1032-7.
- Trachana M, Roilides E, Gompakis N, Kanellopoulou K, Mpantouraki M, Kanakoudi-Tsakalidou F. Case report. Hepatic abscesses due to *Aspergillus terreus* in an immunodeficient child. *Mycoses* 2001;44:415-8.

17. Cuenca-Estrella M, Ruiz-Díez B, Martínez-Suárez JV, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. Comparative *in vitro* activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:149-51.
18. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(Suppl 1):7-10.
19. Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:62-8.
20. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001;97:1604-10.
21. Sulhian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001;91:311-8.
22. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3223-8.
23. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, Sulhian A, Gluckman E, Derouin F, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: Increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:939-43.
24. Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, et al. Comparison between Wako-WB003 and Fungitec G tests for detection of (1- $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal* 1997;11:73-7.
25. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1- $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995;345(8941):17-20.
26. Evans R, Ho-Yen DO. Nested PCR is useful to the clinician in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect* 2000;40:207-8.
27. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001;39:3617-22.
28. Hebart H, Offler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Ohme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000;181:1713-9.
29. Martin C, Roberts D, Van Der WM, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3735-42.
30. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999;37:1871-5.
31. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1169-75.
32. Evans R, Ho-Yen DO. Nested PCR is useful to the clinician in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect* 2000;40:207-8.
33. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001;39:3617-22.
34. Martin C, Roberts D, Van Der WM, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:3735-42.
35. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999;37:1871-5.
36. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1169-75.
37. Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Mechanisms of fungal resistance: An overview. *Drugs* 2002;62:1025-40.
38. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:643-58.
39. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:643-58.
40. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A. 1997. Vilanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ref Type: Report.
41. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. [Submitted]. 2002. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Ref Type: Report.
42. Cuenca-Estrella M, Lee W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado EWDW, Rodríguez-Tudela JL. Comparative evaluation of NCCLS M27-a and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; In press.
43. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. M38-P. 1998. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ref Type: Report.
44. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Present status of the detection of antifungal resistance: The perspective from both sides of the ocean. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(Suppl 2):46-53.
45. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, et al. Multicenter comparison of the sensitive YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:591-5.
46. Arikian S, Hascelik G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:107-11.
47. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between *in vitro* susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: Results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1289-90.
48. Dannaoui E, Colin S, Pichot J, Piens MA. Evaluation of the E test for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:228-32.
49. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001;39:1360-7.
50. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between *in vitro* susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: Results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1289-90.
51. Dannaoui E, Colin S, Pichot J, Piens MA. Evaluation of the E test for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:228-32.
52. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001;39:1360-7.
53. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: Evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999;1:247-61.
54. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: Evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999;1:247-61.
55. Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:981-7.
56. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1504-12.
57. Rex JH, Walsh TJ, Nettleman M, Anaissie EJ, Bennett JE, Bow EJ, et al. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2001;33:95-106.