

# Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos

Ignacio Gadea<sup>a</sup>, Manuel Cuenca-Estrella<sup>b</sup>, Estrella Martín<sup>c</sup>, Javier Pemán<sup>d</sup>, José Pontón<sup>e</sup> y Juan Luis Rodríguez-Tudela<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología Médica. Fundación Jiménez Díaz. UTE. Madrid. <sup>b</sup>Departamento de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme. Sevilla. <sup>d</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>e</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Bilbao. España.

**Las infecciones fúngicas constituyen un problema diagnóstico y terapéutico de interés creciente debido, ante todo, al incremento y gravedad de las infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. Los métodos diagnósticos basados en el cultivo son lentos y con sensibilidad insuficiente, por lo que se están desarrollando métodos diagnósticos basados en la detección de componentes genéticos, antigenicos o metabólicos específicos de los hongos, que permiten un diagnóstico y un tratamiento dirigido precoces. Por otra parte, se han estandarizado métodos para el estudio de la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos, reproducibles y adaptables a un laboratorio asistencial, que permiten la detección de resistencias *in vitro* que se correlacionan con peor evolución clínica. En este trabajo revisamos los principales procedimientos microbiológicos para el diagnóstico de las infecciones causadas por hongos y los métodos desarrollados para los estudios de sensibilidad a los antifúngicos.**

**Palabras clave:** Antifúngico. Micoses.

Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing

**Fungal infections are a diagnostic and therapeutic problem of increasing concern due to the frequency and severity of disseminated infection in immunocompromised patients. Culture-based methods are characteristically slow and have poor sensitivity; hence, other methods, based on the detection of fungus-specific genetic, antigenic and metabolic components are being developed to enable early diagnosis and specific treatment. Moreover, reproducible antifungal susceptibility methods that can be adapted for use in clinical laboratories have been standardized to allow *in vitro* detection of resistance, which correlates with a less favorable clinical outcome. In this paper we review the main microbiological procedures**

**available for the diagnosis of fungal infections and for antifungal susceptibility testing.**

**Key words:** Antifungal. Micoses.

## Introducción

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, coexisten micosis invasoras oportunistas con otras causadas por hongos muy adaptados para la supervivencia en los tejidos infectados, las llamadas micosis primarias, unas endémicas que se comportan como micosis profundas y otras ubicuas, que afectan a piel y mucosas. Con menos frecuencia, se encuentran las micosis subcutáneas, caracterizadas por la agresividad local y poca tendencia a la diseminación a distancia, y que suelen contar con antecedentes traumáticos que justifican la inoculación del hongo<sup>1,2</sup>.

El cultivo sigue siendo el “patrón oro” del diagnóstico microbiológico, permite la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad; pero frecuentemente requiere muestras obtenidas por métodos invasores, no diferencia entre infección y colonización, presenta baja sensibilidad y es un método lento. Por este motivo se han diseñado otros métodos diagnósticos, más rápidos y sensibles, basados en la detección de antígenos, productos metabólicos específicos o material genético de los hongos. Además, en la última década se han desarrollado varios métodos para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, con buena reproducibilidad inter-laboratorio y cierta capacidad para detectar la resistencia a estos fármacos<sup>3</sup>.

## Consideraciones clínicas

Las infecciones fúngicas pueden causar un gran número de entidades clínicas, con manifestaciones variadas que dependen del lugar de infección y del tipo de paciente. De ellas, las micosis profundas oportunistas son las que han adquirido un protagonismo especial en los últimos tiempos debido, entre otros motivos, al aumento de incidencia, a su gravedad y a la trascendencia del diagnóstico precoz. Sin tratamiento adecuado, la mortalidad de las infecciones fúngicas sistémicas es muy alta, lo que unido a los costes de hospitalización que este tipo de infecciones genera, las convierten en entidades de gran trascendencia en la práctica diaria en el medio hospitalario.

Correspondencia: Dr. I. Gadea.  
Departamento de Microbiología Médica. Fundación Jiménez Diaz. UTE.  
Avda. Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid. España.  
Correo electrónico: iggadea@telefonica.net

Manuscrito recibido el 24-11-2006; aceptado el 2-1-2007.

El papel del laboratorio de microbiología para el diagnóstico de las micosis es de una gran importancia, con la detección e identificación del agente causal de la infección unido a la elección un tratamiento adecuado como objetivos prioritarios; pero el enfoque es diferente según el tipo de micosis de que se trate: *a)* en las micosis sistémicas, el diagnóstico micológico basado en el cultivo se caracteriza por su lentitud y su baja sensibilidad; requiriendo, por tanto, nuevos métodos complementarios que mejoren la sensibilidad y el tiempo de respuesta; *b)* las micosis superficiales y cutáneas se diagnostican mediante el examen directo y cultivo de las muestras de piel y anejos cutáneos<sup>2</sup>; *c)* las micosis subcutáneas están causadas por hongos ambientales inoculados directamente en el tejido celular subcutáneo mediante un traumatismo, incluyen la cromoblastomicosis, esporotrichosis, micetomas y una serie de cuadros poco frecuentes: rinosporidiosis, entomphthoromicosis y lobomicosis<sup>2</sup>; y se diagnostican fundamentalmente por el examen microscópico directo y el cultivo de las muestras, en algunas de ellas, como la lobomicosis, el hongo causal aún no ha podido ser cultivado<sup>2</sup>, y *d)* existen otras micosis oportunistas que están causadas por hongos que se aíslan con poca frecuencia, y que constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades que tienen en común la situación del paciente, la gravedad y la relativa dificultad de diagnóstico. Por otra parte, el diagnóstico etiológico es muy importante, pues la respuesta a los distintos antifúngicos varía con las especies implicadas. En este grupo se incluyen: neumocistosis, fusariosis, penicilinosis, zigomicosis, pseudallescheriasis, pitiosis, infecciones por *Dipodascus capitatus*, trichosporonosis, infecciones por *Scedosporium prolificans* y otras<sup>4-6</sup>.

Existe una cierta controversia sobre la utilidad clínica de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. La mayoría de los expertos coinciden en señalar que los estudios de sensibilidad no son necesarios en todos los enfermos, ya que la información epidemiológica establece cuál puede ser el tratamiento empírico más adecuado. Otros especialistas opinan que estas pruebas deberían realizarse en todos los aislamientos procedentes de infecciones profundas, particularmente cuando se aíslan en hemocultivos o en muestras tisulares, quizás deberían hacerse habitualmente en cepas procedentes de enfermos en los que se ha producido un fracaso terapéutico, pacientes que han recibido profilaxis o tratamiento antifúngico previo, y en aislamientos pertenecientes a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su espectro de sensibilidad *in vitro*<sup>3,7</sup>.

## Recogida de la muestra

La recogida de la muestra es uno de los eslabones fundamentales para la realización de un diagnóstico microbiológico adecuado, pero las normas de recogida no difieren grandemente de las normas utilizadas para la obtención de patógenos bacterianos, con los que habitualmente debe realizarse en diagnóstico diferencial.

## Transporte

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio rápidamente, sin conservantes. Las muestras deben ser transportadas en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos; sin embargo, las muestras dermatológicas

es mejor transportarlas en recipientes secos (placa de Petri, papel de fotografía negro, entre dos portas o en contenedor estéril).

## Manejo de las muestras en el laboratorio

Todas las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Hay pocos estudios sobre el descenso de la viabilidad de los hongos en función de los tiempos de demora y de los métodos de transporte de las muestras. Es conocida la dificultad de recuperar *Rhizopus arrhizus* en muestras demoradas y, también, la pérdida de viabilidad de algunos hongos por la desecación, temperatura elevada ( $> 37^{\circ}\text{C}$ ) o baja ( $< 10^{\circ}\text{C}$ ), sobrecrecimiento bacteriano, presencia leucocitos, etc. La refrigeración puede comprometer el aislamiento de hongos dermatofitos, *Malassezia* spp. e *Histoplasma capsulatum*.

## Procesamiento de la muestra

En términos generales, los procedimientos utilizados en el laboratorio de bacteriología son adecuados para el cultivo de hongos, pero hay que tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana es inferior en el caso de los hongos con respecto a las bacterias y ello obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra, y será realizado cuanto antes, utilizando el medio de cultivo y la temperatura de incubación más adecuada. El tipo de procesamiento y los medios utilizados dependen de las características de cada muestra. De este modo, las muestras tisulares deben ser troceadas, no trituradas, e inoculadas en pequeños trozos en el medio de cultivo; las secreciones respiratorias claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo, las muestras fluidas y los líquidos orgánicos deben concentrarse por centrifugación o filtración, siempre que haya suficiente cantidad; la orina se sembrará para recuento, aunque no está claro qué recuento de levaduras en orina es significativo.

Siempre que sea posible, las muestras deben ser sometidas a examen microscópico directo. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor) y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación definitiva por cultivo, todo ello en pocos minutos y con métodos muy sencillos. En algunos casos, el diagnóstico microscópico puede ser la única evidencia de infección fúngica y, en otros, su negatividad puede sustentar la interpretación de aislamientos como contaminantes. La escasez de la muestra es, en la práctica, la única razón para no efectuar la observación microscópica en beneficio del cultivo. Se utilizan montajes húmedos, tinciones fijas y diversas técnicas histológicas para las muestras de tejidos.

## Selección de medios y condiciones de incubación

Aunque se pueden utilizar medios no selectivos, la utilización de medios selectivos es el procedimiento más habi-

tual; para ello, se añaden antibióticos a los medios para inhibir el crecimiento bacteriano y, en diversas situaciones, el crecimiento de determinados hongos considerados contaminantes. Los agentes selectivos más utilizados son antibacterianos (cloranfenicol, gentamicina), y también inhibidores de hongos como la cicloheximida (actidiona), que es especialmente útil en las muestras cutáneas y respiratorias de micosis sistémicas endémicas. El medio más característico y clásico es el agar glucosado de Sabouraud (AGS), que es el medio más utilizado para la descripción de las características de la mayoría de los hongos. Se utilizan medios enriquecidos para las micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, blastomicosis). Otros medios, denominados diferenciales, permiten la identificación del hongo basada en la apariencia de éste en dicho medio, merced a la adición de determinados componentes como, por ejemplo, sustancias cromógenas, o indicadores de pH. Otros contienen algún componente (p. ej., ácido cafeico) destinado a aislar un agente concreto (*Cryptococcus neoformans*), favorecer la identificación de ciertas especies (p. ej., medio de Czaapeck), u obtener estructuras de reproducción sexual (p. ej., agar acetato, agar patata-zanahoria). La buena calidad de los medios es indispensable para conseguir el aislamiento y la identificación de los hongos y debe ser evaluada utilizando las cepas de control adecuadas para cada medio. El soporte habitual para los medios de cultivo en micología suele ser tubos de cristal o placas de Petri (90 mm). Los tubos tienen la ventaja de soportar incubaciones prolongadas y aumentan la seguridad en el caso de sospecha de micosis endémicas, pero debe asegurarse el intercambio de aire a través del tapón. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos es 30 °C y no ofrece ninguna ventaja la incubación simultánea a 30 y a 37 °C. La temperatura de 37 °C debe reservarse para los hongos dimórficos o algún hongo que se desarrolle mejor a esta temperatura. Una estufa a 37 °C es también necesaria para verificar la tolerancia a esta temperatura. Los cultivos de hongos deben incubarse durante 3-4 semanas antes de ser desecharos; sin embargo, hay muestras que se pueden eliminar antes (p. ej., exudado vaginal).

## Identificación

A diferencia de la identificación bacteriana, la identificación de los hongos requiere de la obtención de datos morfológicos mediante la observación microscópica de los aislamientos, mucho más minuciosa en el caso de los hongos filamentosos, que comprenderá el tipo de talo, la morfología de las estructuras vegetativas, la forma de las células conidiógenas, la descripción de las conidias, de las estructuras de reproducción sexual, etc. Para la identificación de las levaduras es muy útil la utilización de medios cromógenos que se complementará con la observación de la morfología desarrollada en agares morfológicos y por las pruebas de asimilación de compuestos carbonados y nitrogenados, mediante galerías comerciales o métodos caseros. En ocasiones puede ser necesaria la realización de pruebas de fermentación. La identificación molecular de los aislamientos fúngicos está todavía limitada a determinados laboratorios especializados, se basa en los mapas de restricción de fragmentos del operón ribosomal, di-

geridos con un panel de enzimas de restricción, que permite la elaboración de árboles filogenéticos<sup>8</sup>.

## Informe de los resultados

El diagnóstico micológico se completa cuando la información llega al conocimiento del médico responsable del paciente. La observación microscópica debe ser informada inmediatamente ya que aporta una importante ayuda al clínico; sus pacientes pueden salir de la consulta de dermatología con un diagnóstico presuntivo (dermatofitosis), que habrá que confirmar con el cultivo, o definitivo (pitiriasis versicolor). Otras observaciones positivas permiten una orientación terapéutica (mucormicosis, aspergilosis, etc.). Los cultivos negativos son informados, habitualmente, a las 4 semanas de incubación, aunque la prolongación de la incubación después de 3 semanas aporta poca información adicional. Los cultivos positivos se informarán en el momento en el que se disponga del crecimiento. Cuando el significado del aislamiento del hongo sea dudoso o se requieran aislamientos sucesivos, debe hacerse constar así en el informe. En los aislamientos poco habituales, un pequeño resumen de las características del hongo puede ser fundamental para el manejo clínico.

## Estudios de sensibilidad

Todo el proceso de recogida de muestras, transporte y conservación de las cepas/muestras destinadas a la realización de un estudio de sensibilidad a los antifúngicos sigue los procedimientos habituales en el laboratorio de microbiología. Las especies fúngicas en las que se realizan estudios de sensibilidad están clasificadas en el grupo 2 desde el punto de vista de la bioseguridad, por lo que no deben manejarse en condiciones especiales. Si las pruebas de sensibilidad se hacen para conocer la mejor alternativa terapéutica en un enfermo concreto, deberían realizarse de forma rápida, intentando ofrecer una información útil para el manejo del enfermo. Esta capacidad de respuesta rápida sólo suelen tenerla las instituciones sanitarias que hacen las pruebas de forma habitual. Para los estudios epidemiológicos diferidos, las cepas deben conservarse siguiendo procedimientos habituales: 8 semanas a 4 °C en un subcultivo en medios para hongos como agar Sabouraud o agar patata glucosado, o bien la congelación o liofilización si se van a diferir más tiempo<sup>9</sup>. El envío de muestras o cepas a un laboratorio de referencia, debe utilizarse un sistema de envío homologado, que cumpla la normativa europea sobre transporte de muestras y cepas clínicas. Para la preparación de los inóculos debe partirse siempre de un subcultivo fresco de las cepas<sup>10</sup>.

## Selección de medios y condiciones de incubación. Cultivos

En general se utilizan medios sintéticos definidos, como el RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) con o sin glucosa. Se deben hacer pruebas de esterilidad del medio así como de pH, que debe situarse alrededor de 7,0 ± 0,3. En caso contrario, los antifúngicos pueden perder parte de su capacidad inhibitoria. Los antifúngicos

deben obtenerse en forma de sustancia valorada solicitándolo al laboratorio que los fabrica o en aquellos casos en los que sea posible, comprándolos a un distribuidor acreditado. Debe conocerse el número de lote, potencia, fecha de caducidad y condiciones de conservación. Las preparaciones clínicas no deben emplearse.

Los métodos de referencia describen con precisión todo el proceso de preparación de soluciones madre de los antimicrobianos, de las placas o tubos con concentraciones decrecientes, del inóculo, de la forma de inoculación y de lectura. Si se decide utilizar un método comercial deben seguirse fielmente las instrucciones del fabricante<sup>9-12</sup>. Las condiciones de incubación no son especiales. Generalmente se cultivan en atmósfera normal, a 30 o 35 °C, durante 24-72 h, dependiendo del método y de las especies fúngicas.

## Criterios para la interpretación de los resultados

La finalidad de los estudios de sensibilidad *in vitro* es la detección de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos y, de esta forma, poder predecir la resistencia clínica. Sin embargo, la correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la respuesta al tratamiento de los enfermos con micosis no es muy elevada, por lo que no existen unos criterios claros para su interpretación.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) estadounidense ha establecido puntos de corte para interpretar los resultados de estas pruebas con fluconazol, itraconazol, fluorocitosina y voriconazol (tabla 1). Estos puntos de corte sólo son aplicables en infecciones por levaduras y tienen una utilidad clínica limitada. Respecto a los hongos filamentosos debe señalarse que no existen puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad. No obstante, en los últimos años se han comunicado fallos terapéuticos con itraconazol en infecciones producidas por cepas de *Aspergillus* con concentración inhibitoria mínima (CIM)  $\geq 8$  mg/l. Para anfotericina B, algunos autores han comprobado que cepas de *Aspergillus* spp. y de *Rhizopus* spp. se comportan como resistentes en modelos animales, cuando tienen una CIM de anfotericina B  $\geq 2$  mg/l<sup>13</sup>.

## Información de los resultados

Los resultados de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos deben informarse como los de otros antibiogramas, indicando el valor de la CIM. En caso de utilizar el método del CLSI, podría informarse como sensible o resistente, siguiendo los puntos de corte recogidos en la tabla 1. Sin embargo, dadas las limitaciones antes expuestas sobre la correlación de estas pruebas con la clínica, se aconseja que los laboratorios que hagan estas pruebas de sensibilidad mantengan una relación estrecha con los médicos que las solicitan, individualizando cada caso y colaborando en la toma de decisiones terapéuticas.

En caso de realizar estudios epidemiológicos periódicos, se debería informar a toda la institución sanitaria sobre la distribución de especies y el perfil de sensibilidad, lo que ayudaría a elegir los tratamientos empíricos más adecuados.

**TABLA 1. Puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad en levaduras, según el CLSI estadounidense**

Antifúngico	Sensible	Sensible dependiente de la dosis	Intermedio	Resistente
Fluconazol	$\leq 8$	16-32	–	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	–	$\geq 1$
Voriconazol	$\leq 1$	2	–	$\geq 4$
Flucitosina	$\leq 4$	–	8-16	$\geq 32$

Datos en mg/l.

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

## Métodos rápidos aceptados para la determinación de la sensibilidad a antifúngicos

La determinación de la CIM por técnicas de dilución en caldo no es un método aplicable para laboratorios clínicos que deben hacer estudios de sensibilidad a diario, que sufren la presión asistencial y que deben ofrecer información rápida para que tenga utilidad terapéutica. Por ello se han desarrollado técnicas de difusión en agar, como la M44-A del CLSI estadounidense, validado para fluconazol y voriconazol, y métodos comerciales con la intención de ofrecer una alternativa rápida, práctica y barata para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos<sup>14</sup>.

Existen varios métodos comerciales que han demostrado una buena correlación con los estándares de referencia. Esta correlación es aun más apreciable con los azoles, fármacos para los que se han descrito la mayor parte de las resistencias. Por tanto, los laboratorios asistenciales pueden emplear estos métodos para detectar con fiabilidad y rapidez la resistencia a los azoles, sobre todo la resistencia *in vitro* a fluconazol en levaduras<sup>14</sup>. Entre los métodos comerciales que pueden emplearse en un laboratorio clínico destacan las técnicas de difusión en agar con discos o tabletas de antifúngicos como el NeoSensitabs® (A/S Rosco), o el E-test® (AB Biodisk). Otras técnicas incorporan una adaptación de la microdilución en caldo con o sin colorantes como el Sensititre YeastOne® (TREK Diagnostic Systems Ltd.), el Fungitest® (Bio-Rad) y el ATB Fungus 2® (BioMérieux). Todas ellas han mostrado una fiabilidad elevada para detectar la resistencia a fluconazol. Por último, un enfoque novedoso consiste en automatizar la lectura de las placas de microdilución mediante una cámara de vídeo y un programa informático. Esta técnica es la que incorpora el sistema WIDER I® (Soria Melguizo), que también ha mostrado una gran fiabilidad en la detección de resistencias en levaduras.

## Métodos de diagnóstico rápido. Técnicas no convencionales

Basados en la detección de antígenos, sustancias producidas por los hongos, técnicas serológicas novedosas y detección de material genético. En general persiguen un aumento de la sensibilidad y especificidad diagnóstica y una mayor rapidez en la emisión de los resultados. La detección de antígeno capsular de *C. neoformans* ya es una técnica clásica, a la que se han añadido recientemente la de

tección de diferentes antígenos de *Candida*, *Aspergillus*, detección de glucano, detección de anticuerpos frente a la fase micelial de las levaduras y otras. La detección, mediante un análisis inmunoenzimático (ELISA) comercializado (Platelia *Aspergillus* de Bio-Rad), de galactomanano, un antígeno específico del género *Aspergillus*, permite, en poblaciones seleccionadas, el diagnóstico de la aspergilosis invasora con elevada especificidad y sensibilidad<sup>15</sup>.

Para el diagnóstico de la candidosis invasora no existe una prueba aceptada universalmente. Los resultados obtenidos con la detección de manano por ELISA y los anticuerpos antimananos no son muy esperanzadores, siendo globalmente inferiores a los del cultivo. Las pruebas comercializadas actualmente detectan anticuerpos contra el manano (Bio-Rad) y la enolasa (Biomerica) y los antígenos del micelio de *Candida albicans* (Laboratorios Vircell). Estas pruebas deben utilizarse para estudiar muestras seriadas del paciente, lo que permite analizar la evolución de los títulos de anticuerpo y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos. La detección simultánea de manano y anticuerpos antimananos (Bio-Rad) puede mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de candidosis invasora<sup>16-19</sup>.

La detección de (1 → 3)-β-D-glucano en plasma es otra posibilidad diagnóstica en las micosis producidas por *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y otros hongos. No es eficaz para la detección de *C. neoformans*, mucorales, *Trichosporon* y basidiomicetos en general. El ser humano carece de glucanasas para digerir (1 → 3)-β-D-glucano y por tanto su eliminación es lenta. Existen varias pruebas comercializadas para la detección (1 → 3)-β-D-glucano, siendo el Fungitell® (anteriormente denominada Glucatell® [Associates of Cape Cod]) la más recientemente comercializada y la que puede obtenerse en España. Las pruebas para detectar (1 → 3)-β-D-glucano pueden presentar falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de acetato de celulosa, o en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes anticancerosos y sulfamidas.

La aparición de nuevas técnicas moleculares abre un nuevo camino en el diagnóstico de la infección fúngica: la detección de ácidos nucleicos. Se utilizan métodos de hibridación y amplificación convencionales junto a nuevos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (Light Cycler, Roche). El inconveniente fundamental de dichas técnicas es el elevado coste, la necesidad de personal especializado, falta de pruebas normalizadas comerciales y la falta de estudios que demuestren qué tipo de muestra y procedimiento es el más indicado.

## Procedimientos no aceptables

Deben considerarse como inaceptables todos los resultados obtenidos mediante modificaciones no validadas de las técnicas de referencia. En el caso de los estudios de sensibilidad, es inaceptable que no se incluyan cepas control, y no podrían validarse los resultados si las CIM de las cepas control no coinciden con los recogidos por los estándares.

res. Por último, si se va a utilizar un método comercial, para diagnóstico rápido, identificación o estudio de sensibilidad, deben seguirse estrictamente las recomendaciones del fabricante. Variaciones en el protocolo pueden alterar significativamente los resultados de la prueba, reduciendo su aplicabilidad clínica.

## Bibliografía

1. Merz WG, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 588-600.
2. Gadea I. Dermatomicosis y micosis tropicales. Medicine. Vol. 68. Barcelona: Ediciones Doyma S.L.; 2002. p. 47-56.
3. Gavalda Santapau J, Ausina V. Infecciones por *Aspergillus*. Medicine. Vol. 68. Barcelona: Ediciones Doyma S.L.; 2002. p. 31-6.
4. Cuena-Estrella M. Infecciones profundas por otros hongos patógenos humanos. Medicine. Vol. 68. Barcelona: Ediciones Doyma S.L.; 2002. p. 37-46.
5. Edson RS, Fernández-Guerrero ML, Roberts GD, Van Scoy RE. Clinical and laboratory features of cryptococcosis. A five-year experience. Minn Med. 1987;70:337-42.
6. Cuena-Estrella M. Infecciones por *Candida* spp. Infecciones superficiales y profundas. Medicine. Vol. 68. Barcelona: Ediciones Doyma S.L.; 2002. p. 19-28.
7. Rex JH, Pfaffer 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.
8. De hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi: Centralbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands, Universitat Rovira y Virgili, Reus, Spain, 2000.
9. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuena-Estrella M, Pfaffer MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela LJ, et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol. 2005;43:3884-9.
10. Gómez-López A, Aberkane A, Petrikou E, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuena-Estrella M. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. J Clin Microbiol. 2005;43:1251-5.
11. Rodríguez-Tudela JL, Cuena-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:400-4.
12. Rodríguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikou E, Mosquera J, Denning DW, Cuena-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. J Clin Microbiol. 2003;41:5236-7.
13. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, M38-A: Wayne Pa, 2002.
14. Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline, M44-A: Wayne, Pa, 2004.
15. Maertens J, Deeren D, Dierickx D, Theunissen K. Preemptive antifungal therapy: still way to go. Curr Opin Infect Dis. 2006;19:551-6.
16. Ponton J, Moragues MD, Quindos G. Non-culture based diagnostics. En: Calderone R, editor. *Candida* and Candidiasis. Vol. 1. Washington: American Society for Microbiology; 2002. p. 395-425.
17. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. Evaluación de una nueva técnica comercializada (*Candida albicans* IFA IgG) para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. Enferm Infect Microbiol Clin. 2004;22:83-8.
18. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, et al. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and anti-mannan antibodies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;51:95-101.
19. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol. 1999;37:1510-7.