

¿Ha servido para algo una década estandarizando las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos?

Juan Luis Rodríguez Tudela y Manuel Cuenca Estrella

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

En el año 1992 se publicó el primer documento que proponía una metodología estandarizada para detectar *in vitro* levaduras resistentes a los antifúngicos¹. A partir de ese momento, varios grupos empezaron a desarrollar diferentes técnicas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos e intentaron correlacionar los resultados obtenidos en el laboratorio con la evolución clínica del paciente²⁻⁵. Asimismo, en diversos países del mundo se realizaron estudios epidemiológicos analizando las tasas de resistencia *in vitro*⁶⁻¹⁰. En el año 1997 se publicaron los puntos de corte para fluconazol e itraconazol y en el año 1998 apareció la primera proposición de normativa para el estudio de sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos^{11,12}. Aunque ligeramente retrasados, los investigadores europeos han hecho un considerable esfuerzo y como resultado del mismo aparecerá durante el año 2002 la primera proposición de normativa para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras fermentadoras de glucosa, desarrollada por el subcomité de antifúngicos del European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST)¹³.

Esta generación de información ha conducido al desarrollo de dos corrientes de opinión contrapuestas, definidas por dos grupos de profesionales: quienes consideran inútiles estas pruebas y quienes creen que pueden ayudar en el tratamiento de las micosis. El objetivo de este editorial es compartir nuestra experiencia, tras varios años de investigación y análisis, del significado de los resultados obtenidos con las técnicas de sensibilidad a los antifúngicos.

Para ello se repasan los conocimientos actuales sobre cada uno de los antifúngicos de interés clínico, empezando por la anfotericina B. Curiosamente, con este fármaco no se generan problemas metodológicos en el laboratorio, pero los resultados *in vitro* apenas se correlacionan con la evolución clínica del paciente. La mayoría de los expertos creen que esta falta de correlación se debe a que los estándares actuales de sensibilidad *in vitro* no tienen la capacidad para diferenciar cepas resistentes y sensibles a anfotericina B. De momento se recomienda no utilizar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas con la técnica recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de Estados

Unidos para guiar el tratamiento con este antifúngico¹. El estándar europeo no incluye la anfotericina B en su documento, aunque las CMI obtenidas con esta metodología no difieren de las derivadas del uso de la normativa recogida en el documento NCCLS-M27A¹. En proceso de investigación se encuentran alternativas que recomiendan el uso de diferentes medios de cultivo como el medio para antibióticos n.º 3 (AM3)¹⁴ o el Isosensitest^{®15}. Otros autores defienden que la concentración fungicida mínima (CFM) se correlaciona con la evolución clínica del paciente¹⁶. Sin embargo, la metodología empleada para la determinación de la CFM, que se diferencia mucho de la recomendada para los antibacterianos¹⁷, requiere una evaluación mucho más cuidadosa antes de aceptar que la CFM puede tener relevancia en el tratamiento de los pacientes. Por otra parte, utilizando la técnicas de referencia recomendadas por el NCCLS¹ y el EUCAST¹³, las levaduras con CMI superiores a 2 mg/l son excepcionales, mientras que aquellas especies que se han considerado clásicamente como intrínsecamente resistentes a la anfotericina B, como *Trichosporon asahii*, *Scedosporium apiospermum* o *Scedosporium prolificans*, tienen CMI por encima de ese valor. Esto significa que las técnicas de referencia tienen capacidad para identificar cepas con CMI elevadas. Si se asume esto como cierto, hay que aceptar que tanto las resistencias primaria como secundaria a la anfotericina B son excepcionales en levaduras, aunque en especies poco frecuentes, como *Candida lusitanae* y *Candida haemulonii* pueden existir cepas con resistencia primaria o que desarrollen resistencia secundaria (observaciones sin publicar). Los escasos datos publicados sobre la correlación entre datos *in vitro* y evolución clínica son decepcionantes y, así, en el único análisis basado en un ensayo clínico aleatorio, la correlación entre la evolución del paciente tratado con anfotericina B y las CMI de los microorganismos fue inexistente³. Existen numerosas cepas de hongos filamentosos que tienen CMI elevadas, lo cual explicaría en parte la peor respuesta que presentan este tipo de infecciones al tratamiento con anfotericina B. No obstante, no debe olvidarse que los factores del huésped influyen de forma determinante en la evolución de este tipo de infecciones. Además, en el caso de la anfotericina B convencional existe el factor limitante de la dosis debido a la toxicidad del fármaco, lo que a su vez impide en muchos casos que las concentraciones terapéuticas excedan la CMI del hongo causante de la infección. La realización de los estudios pertinentes con las formas lipídicas, en dosis más elevadas, podría determinar la influencia de este factor.

Afortunadamente, con los azoles la situación es diferente, aunque no completamente satisfactoria. A pesar

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

Manuscrito recibido el 11-01-2002; aceptado el 21-02-2002.

de que se llegó a plantear la inutilidad de realizar pruebas de sensibilidad con estos antifúngicos, la investigación llevada a cabo con diferentes orientaciones metodológicas ha conseguido herramientas de laboratorio que ofrecen resultados adecuados. Esta investigación continua originó la aparición en 1997 de los puntos de corte para fluconazol e itraconazol¹² que, a pesar de su innegable utilidad, tienen la importante limitación de estar basados, casi en su totalidad, en la evolución clínica de la candidosis orofaríngea en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana. Los datos de infección invasora son desafortunadamente escasos y controvertidos. A pesar de estos imponderables, los resultados obtenidos con los azoles son los más consistentes y derivados de ellos es posible afirmar que actualmente la resistencia secundaria no es un problema acuciante en los hongos patógenos. Así, el análisis de la sensibilidad de 503 levaduras aisladas de hemocultivos en España indica que no hay ninguna cepa resistente a fluconazol en *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*, y sólo el 1,9% en *Candida albicans*. Por el contrario, el 42,8% de las cepas de *Candida glabrata* son resistentes a fluconazol y como ya es conocido, *Candida krusei* es intrínsecamente resistente a este antifúngico (observaciones sin publicar). Entre los hongos filamentosos y en aquellas especies sensibles al itraconazol como *Aspergillus*, la resistencia secundaria es anecdótica. Tras estas consideraciones, es importante determinar si estas cifras tienen algún significado o, lo que es lo mismo, si las CMI de los azoles se correlacionan con la evolución clínica del paciente. En lo referido a este aspecto, nos gustaría que el lector contestara la siguiente pregunta, antes de continuar leyendo este texto: ¿los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antibacterianos se correlacionan uniformemente con la evolución clínica del paciente? Por desgracia, la correlación es similar a la obtenida con las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. A aquellos que piensen que estamos sobrestimando la falta de correlación les recomendamos la lectura de los capítulos dedicados a este tema en las sucesivas ediciones del libro *Antibiotics in laboratory medicine*¹⁸ en el que se citan numerosos ejemplos que indican que los pacientes infectados por bacterias sensibles responden en un porcentaje bastante inferior al 100%, y que entre el 40 y el 60% de aquellos infectados por bacterias resistentes responden al tratamiento. En el terreno de los antifúngicos, los datos son más limitados pero igualmente ilustrativos. Así, el análisis del trabajo que realizaron Rex et al para obtener los puntos de corte de fluconazol e itraconazol para levaduras ofrece las siguientes cifras de correlación: de los 99 pacientes con infección invasora y tratados con fluconazol, el 71% respondió cuando las cepas eran sensibles y el 58% cuando eran resistentes¹². La correlación es más evidente cuando se trata de candidosis orofaríngea y, así, el 92% de los pacientes con cepas sensibles respondieron al tratamiento y sólo el 41% de los infectados por microorganismos resistentes. Con itraconazol sólo se incluyeron pacientes con candidosis orofaríngea y las cifras de respuesta fueron muy similares a los resultados obtenidos con fluconazol, aunque en este análisis queda reflejado que la farmacocinética de este

antifúngico es esencial en la respuesta al tratamiento y, por lo tanto, en la correlación¹².

En conclusión, la disponibilidad de metodologías estandarizadas para determinar la sensibilidad a los antifúngicos es esencial, ya que ofrece un lenguaje común para toda la comunidad científica. Sin embargo, la utilidad de estos resultados es escasa, a menos que se determine con exactitud su significado clínico. Desgraciadamente, esta interpretación es muy complicada debido a la influencia de numerosas variables entre las que se incluyen las siguientes: a) factores metodológicos, "la CMI no es una medida física"; b) factores del huésped como su inmunodepresión o localización de la infección, y c) factores farmacocinéticos y farmacodinámicos del antimicrobiano. Por lo tanto, un tratamiento adecuado de un paciente infectado con una cepa sensible no garantiza una buena evolución y, asimismo, el tratamiento de un paciente infectado con una cepa resistente no implica un fracaso terapéutico, si bien las posibilidades de que así sea son mayores. Resultados del laboratorio como la CMI ofrecen cierta visión estadística que puede utilizarse como una variable más que determine el éxito o el fracaso terapéutico, pero dicha CMI no puede ser valorada en solitario esperando que justifique la evolución de una compleja enfermedad infecciosa que afecta a un paciente determinado.

Por último, quedan por comentar las posibilidades existentes para intentar mejorar la correlación de estas pruebas con la evolución del paciente. De entrada, debe asumirse que será muy difícil disponer de datos de evolución de enfermos infectados con cepas resistentes a los azoles. Esto se debe a dos razones fundamentales: la primera es que al existir puntos de corte para fluconazol e itraconazol, pocos profesionales van a tratar un paciente con un fármaco que teóricamente no sirve para ese microorganismo; y la segunda es el escaso número disponible de cepas clínicas con resistencia secundaria. Es imprescindible, sin embargo, que se determine la sensibilidad *in vitro* de todas las cepas que se aislen en pacientes enrolados en ensayos clínicos de calidad que evalúen el uso clínico de antifúngicos, lo que permitirá posteriormente realizar estudios de correlación *in vitro/in vivo*. Si, además, logramos que en estos ensayos clínicos se realice la determinación de las concentraciones séricas de los antifúngicos, obtendríamos datos de gran relevancia para determinar esta correlación. Conocida la farmacocinética del antifúngico, el análisis conjunto de los datos farmacodinámicos obtenidos en modelos experimentales y de los obtenidos en ensayos clínicos aclararía cuál de ellos es el que mejor predice el éxito o el fracaso terapéutico.

Para finalizar, conviene especificar con claridad que las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos tienen que ser realizadas por profesionales con experiencia. El aumento de la población inmunodeprimida ha producido un incremento de las infecciones fúngicas y, de manera directa, ha aumentado la demanda de la detección de la resistencia a los antifúngicos en diferentes especies de hongos. Tras el desarrollo de los métodos de referencia, se han comercializado numerosos sistemas que ayudan a que estas determinaciones puedan realizarse en laboratorios asistenciales. Pero, esta facilidad metodológica no garantiza que los resultados que se obtengan sean útiles, a

menos que todo el proceso se haga de una forma controlada. Cualquier laboratorio debería contestar las siguientes preguntas antes de introducirse en la aventura de obtener una CMI de valor incierto: ¿la prueba comercial que estoy utilizando da resultados equivalentes a los obtenidos con métodos de referencia? ¿Incluyo cepas de referencia contrastadas en el control de calidad cada vez que realizo una de estas pruebas? ¿Informo de los resultados de forma inteligible para que los médicos responsables del paciente entiendan sus limitaciones? ¿La metodología que estoy empleando es reproducible dentro del laboratorio? ¿Y con otros laboratorios? Es importante que la autocrítica prevalezca en nuestra profesión, máxime cuando se realizan ensayos de laboratorio cuya automatización genera una seguridad que en la mayoría de los casos es falsa. En el mundo de la infección fúngica invasora la escasez de antifúngicos disponibles obliga a extremar este tipo de medidas, ya que el informe de que una cepa es resistente *in vitro*, sin la discusión pormenorizada del caso con el clínico que lo atiende, puede llevar a este último a desaconsejar un tratamiento que puede ser vital para la recuperación del paciente.

Bibliografía

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. 1997. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
2. Laguna F, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV, Polo R, Valencia E, Díaz-Guerra TM, et al. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1997;24:124-30.
3. Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, Nelson PW, Webb CD. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:40-4.
4. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingróff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001;14:643-58.
5. Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV, Dronda F, Laguna F, Chaves F, Valencia E. Correlation of in-vitro susceptibility test results with clinical response: A study of azole therapy in AIDS patients. J Antimicrob Chemother 1995;35:793-804.
6. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. J Clin Microbiol 1998;36:1886-9.
7. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35: 19-25.
8. 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.
9. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 1999;29:253-8.
10. 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.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. M38-P. Vilanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
12. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingróff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Infect Dis 1997;24:235-47.
13. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J Clin Microbiol 2001;39:525-32.
14. Rex JH, Cooper CR Jr, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:906-9.
15. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2070-4.
16. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. J Infect Dis 1998;177:425-30.
17. Peterson LR, Shanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: Technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 1992;5:420-32.
18. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, 2001.