

Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos

Ignacio Gadea y Manuel Cuenca-Estrella por parte de los Grupos de Estudio de la Infección Fúngica Invasora (MICOMED) y de Estudio de la Infección en el Trasplante (GESITRA) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)

En estas recomendaciones se analizan diferentes aspectos del diagnóstico de laboratorio de las infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunodeprimidos.

Son recomendaciones basadas en las indicaciones establecidas en diferentes estudios y en opiniones de expertos. Además, se adjuntan los niveles de evidencia para cada recomendación.

Palabras clave: Infección fúngica invasora. *Aspergillus*. *Candida*.

Guidelines for fungal diagnoses and antifungal sensitivity studies

The guidelines presented herein, which are based on the indications established by various studies and expert opinions, analyze several issues related to laboratory diagnosis of invasive fungal infections in immunosuppressed patients.

Key words: Invasive fungal infections. *Aspergillus*. *Candida*.

Introducción

Durante las tres últimas décadas, la relevancia clínica de las infecciones causadas por hongos ha ido aumentando. Las razones son varias, pero entre ellas destacan el aumento de pacientes inmunodeprimidos y el incremento de la agresividad de las técnicas diagnósticas y terapéuticas, que han hecho crecer la población susceptible de sufrir una micosis invasiva.

Como en toda la patología infecciosa, un diagnóstico etiológico correcto y precoz es imprescindible para instaurar el tratamiento adecuado y, de esta forma, mejorar el pronóstico del enfermo. Sin embargo, esto no es sencillo en las infecciones fúngicas. Algunos hongos crecen lentamente o infectan tejidos poco accesibles, por los que el diagnóstico por los métodos tradicionales –observación directa y cultivo– puede ser tardío o tener una sensibilidad muy baja. A esta situación hay que añadir el aumento constante de la lista de hongos

patógenos que un laboratorio de microbiología debe ser capaz de identificar, lo cual complica los procedimientos de laboratorio¹⁻³.

Asimismo, la aparición de especies patógenas con resistencia intrínseca a los antifúngicos y de cepas con resistencia secundaria ha determinado la necesidad de desarrollar y estandarizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencias *in vitro*, que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por eso, parece cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos.

En el presente documento se incluyen una serie de recomendaciones sobre las técnicas diagnósticas en micología médica, clasificadas por motivos prácticos en convencionales (microscopia directa y cultivos) y en no convencionales (detección de antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos). En la segunda parte de estas recomendaciones se hace una revisión breve de las técnicas de referencia, así como de los métodos comerciales para la detección de resistencias a los antifúngicos.

En la tabla 1 se especifican los criterios que se han utilizado para realizar las recomendaciones diagnósticas, según la potencia estadística de las evidencias que apoyan el uso de las diferentes técnicas de diagnóstico micológico⁴. Debe indicarse que el *grado de recomendación* es de especial interés en lo que se refiere a los métodos diagnósticos no convencionales, ya que son técnicas que no se encuentran disponibles en muchos laboratorios asistenciales, por lo que algunos microbiólogos no están familiarizados con ellas.

Métodos de diagnóstico micológico

Métodos diagnósticos convencionales

Los métodos diagnósticos convencionales están basados en la observación microscópica y en el cultivo de las muestras clínicas. El cultivo sigue siendo el método estándar para el diagnóstico de las micosis, por lo que no parece oportuno realizar una revisión exhaustiva sobre los métodos tradicionales de diagnóstico. En el año 2001, la Asociación Española de Micología ha publicado una guía donde se detallan las principales técnicas de diagnóstico micológico y de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. La guía incluye información para desarrollar estas técnicas en los laboratorios asistenciales⁵.

En términos generales, la recogida y el transporte de la muestra no requiere medidas especiales, aunque debe ser enviada al laboratorio con rapidez o conservar refrigerada si no es procesada en menos de una hora. El examen microscópico directo es de gran utilidad para la

Correspondencia: Dr. M. Cuenca-Estrella.
Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: m.cuenca-estrella@isci.es

Manuscrito recibido el 8-2-2003; aceptado el 11-6-2003.

TABLA 1. Categorías según el grado de evidencia que permiten hacer recomendaciones sobre la utilidad de un determinado procedimiento diagnóstico o terapéutico

Grados sobre la cualidad científica de la evidencia	Categorías indicando la potencia estadística de la recomendación
I Evidencias apoyadas en al menos un estudio aleatorizado y controlado	A Evidencia de potencia estadística elevada apoyando la utilización
II Evidencias apoyadas en al menos un estudio bien diseñado aunque sin aleatorización (casos-controles, cohortes), en estudios de series temporales o en pequeños estudios sin controlar, pero cuyos resultados puedan ser de vital importancia	B Evidencia de potencia estadística moderada apoyando la utilización
III Opiniones de expertos, experiencia clínica, estudios descriptivos o informes de comités	C Pocas evidencias para apoyar o desaconsejar la utilización D Evidencia de potencia estadística moderada desaconsejando la utilización E Evidencia de potencia estadística elevada desaconsejando la utilización

De McGowan, 1992.

identificación de estructuras fúngicas (levaduras o filamentos), por lo que debe realizarse siempre que sea posible. En los exámenes en fresco se utilizan contrastes que ayudan a identificar los hongos, como la tinta (Parker) o el azul de lactofenol. También puede emplearse el microscopio de fluorescencia aplicando como contraste fluorescente el blanco de calcoflúor. Además, existe la posibilidad de realizar tinciones como la de Gram, Giemsa, azul de metileno o argénticas⁶.

Tras el examen microscópico, las muestras deben sembrarse en varios medios de cultivo. Aunque la mayoría de los hongos crece en medios habituales como el agar sangre y el agar chocolate, también deben utilizarse medios específicos para hongos como el agar glucosado de Sabouraud. En las muestras en las que pueda existir una infección polimicrobiana o flora bacteriana comensal deben emplearse medios selectivos, como el agar Sabouraud con cloranfenicol con o sin gentamicina. En el caso de los hemocultivos, las técnicas basadas en el método de lisis-centrifugación pueden mejorar la sensibilidad de los cultivos tradicionales (bifásicos) y de los sistemas automatizados, por lo que debe valorarse su utilización en enfermos con alto riesgo de padecer micosis invasivas.

Además de lo anterior, pueden hacerse algunas recomendaciones sobre puntos específicos del diagnóstico:

Hay que realizar un esfuerzo para identificar las especies de levaduras y hongos filamentosos

Es conocida la diferente sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies de *Candida* y, sin duda, es previsible que algo parecido ocurra entre diferentes especies de hongos filamentosos. Por ejemplo, existen datos sobre la menor actividad de anfotericina B frente a *Aspergillus terreus* que frente a otras especies de *Aspergillus*⁷⁻⁹; por otra parte, *Scedosporium apiospermum* es sensible a varios antifúngicos, mientras que *S. prolificans* es prácticamente intratable¹⁰⁻¹². La identificación de la mayoría de las levaduras que se aíslan de pacientes está al alcance de casi todos los laboratorios asistenciales, ya que existen métodos comerciales de identificación, como API ID 32C, API 20C AUX, Auxacolor, Candifast, Fungicrom, etc., que tienen una fiabilidad alta, aunque siempre deban

complementarse con un agar que permita el estudio morfológico (agar harina de maíz o agar arroz)¹³. Para identificar algunas especies poco frecuentes en muestras clínicas es necesario recurrir a pruebas adicionales, como la fermentación de azúcares, el crecimiento a diferentes temperaturas, la presencia de ureasa, etc. Más difícil puede ser la identificación de la especie aislada de moho u hongo filamentoso, que en bastantes casos puede requerir el concurso de un centro de referencia, ya que no existen métodos comerciales de identificación para estos hongos. Debe ponerse de manifiesto que la identificación no puede realizarse por el aspecto microscópico de las hifas en las muestras clínicas, sino a través de las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos realizados en medios específicos.

Hay que incluir técnicas que ayuden a distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*

Una de las técnicas más conocidas y utilizadas en la identificación micológica es la incubación de las levaduras en suero durante 90-180 min, a 37 °C. Esta técnica se utiliza para detectar la producción de tubos germinales por parte de los organismos levaduriformes, capacidad que sólo había sido descrita en *C. albicans* y que por tanto ha servido para identificar esta especie. Sin embargo, existen cepas de *C. albicans* que no producen tubos germinales (5-10%) y, además, en los últimos años se ha descrito una nueva especie de *Candida*, *C. dubliniensis*, que puede producir tubos germinales en suero. Varios autores han señalado que *C. dubliniensis* puede ser un patógeno frecuente y que hasta ahora ha sido subestimado por su similitud con *C. albicans*. Además, *C. dubliniensis* presenta una mayor facilidad para desarrollar resistencia a los azoles¹⁴, por lo que su identificación puede suponer decisiones terapéuticas. Por tanto, los laboratorios deben intentar diferenciar estas dos especies; algunos sistemas comerciales (ID 32C, Vitek 2) distinguen ambas especies, pero *C. dubliniensis* tiene un perfil bioquímico muy parecido a *C. albicans*, por lo que no todos los sistemas comerciales de identificación las distinguen. Si se utilizan medios comerciales que no contemplan esta especie en su base de datos, deben realizarse pruebas complementarias entre las que destaca el cultivo a 42-45 °C, temperaturas a la que *C. dubliniensis* no suele crecer¹⁵. Sin embargo, hay

que tener en cuenta que algunas cepas de *C. dubliniensis* crecen a 42 °C y que un número pequeño de aislamientos de *C. albicans* no crecen a 45 °C, por lo que puede ser necesario emplear otras pruebas para su diferenciación.

Empleo de medios de cultivo diferenciales

En el diagnóstico micológico se emplean medios diferenciales cromogénicos que permiten reconocer varias especies de levaduras por el color de la colonia. Estos medios son de gran utilidad para distinguir las infecciones mixtas, micosis que según algunos datos son más habituales de lo que se cree^{13,16}. Ante la presencia de levaduras en una muestra clínica procedente de un enfermo con una micosis invasiva, debería añadirse un medio de cultivo cromógeno. Además, algunos medios diferenciales cromógenos permiten el diagnóstico presuntivo de infecciones por *C. krusei* o *C. glabrata*, lo cual presenta repercusiones terapéuticas. La adición de un medio diferencial cromógeno para levaduras a todas las muestras nobles (estériles en condiciones normales), permitiría adelantar entre 24 y 48 h el diagnóstico de infección mixta y, sobre todo, la presencia de levaduras resistentes al fluconazol. Esta práctica elevaría de manera considerable el coste del diagnóstico, por lo que los laboratorios asistenciales deben decidir sobre su utilización rutinaria basándose en la prevalencia en el centro de especies resistentes al fluconazol¹⁷.

¿Medios en placa o en tubo?

El cultivo de las muestras en medios dispensados en tubos puede ser necesario para el diagnóstico de hongos de crecimiento lento, ya que se evita la contaminación y la desecación del agar. Además, la probabilidad de que se aisle *Histoplasma* u otro patógeno endémico es cada vez mayor, y el cultivo en tubo disminuye el riesgo de contaminación en el laboratorio. Es importante recordar que los cultivos sospechosos de contener un hongo patógeno primario deben manejarse en instalaciones que cumplan las condiciones de bioseguridad GR-3.

Es imprescindible la buena comunicación entre el laboratorio y el clínico que permita la elección de los medios de cultivo, temperatura

y tiempo de incubación adecuados ante la sospecha de una micosis

En los casos de sospecha de infección fúngica invasiva debería realizarse un examen microscópico directo, con blanco de calcoflúor o con una tinción (técnica de impregnación) argéntica, que permita realizar el diagnóstico de micosis invasiva de forma precoz. De cualquier forma, deben ser estudiadas determinadas muestras nobles, como biopsias y lavados broncoalveolares, para detectar la presencia de hongos en todas las ocasiones. Por otra parte, la comunicación con radiólogos y patólogos puede ayudar a diagnosticar la infección, pero no debe olvidarse que la identificación definitiva del patógeno es labor de los microbiólogos y que esta identificación puede tener repercusiones en la elección del tratamiento antifúngico.

Métodos diagnósticos no convencionales

Como ya se ha indicado en el apartado anterior, existe un amplio consenso entre los diferentes especialistas sobre los métodos diagnósticos basados en el cultivo. Sin embargo, el acuerdo es mucho menor en lo que se refiere a las técnicas no convencionales, es decir, aquellas que no se basan en el examen microscópico y en el cultivo del microorganismo. Existen metodologías que han probado ampliamente su utilidad, pero que no están al alcance de todos los laboratorios y otras por el contrario, que aun siendo asequibles, no están suficientemente evaluadas (tabla 2). En este apartado se comentan únicamente las técnicas comerciales disponibles, que se encuentran estandarizadas para su utilización en los laboratorios asistenciales. Otras técnicas en desarrollo, “caseras” o sin evaluar en estudios multicéntricos, no se incluyen en estas recomendaciones.

Diagnóstico de las candidiasis invasivas por métodos inmunológicos

Para el diagnóstico de las candidiasis invasivas se dispone de técnicas basadas en la detección de diferentes antígenos o componentes fúngicos y en la detección de anticuerpos. En los últimos años se han utilizado principalmente técnicas de aglutinación o de enzimoinmunoanálisis (ELISA) para la detección de diferentes compuestos (mananos, glucanos, D-arabinitol, enolasa, etc.).

TABLA 2. Recomendaciones y grado de evidencia de las técnicas diagnósticas micológicas

Técnica diagnóstica	Grado de recomendación	Bibliografía
Métodos convencionales de cultivo e identificación	I-A, II-A	5, 6, 13, 17
Diagnóstico de la candidosis invasora:		
Detección de Ag y Ac mediante ELISA	II-B	19, 20
Detección de Ac frente a tubos germinales de <i>Candida</i>	II-B	21, 22
Técnicas basadas en la aglutinación	II-C	16, 23
Diagnóstico de la criptococosis mediante detección del Ag capsular	I-A	5, 26
Diagnóstico de la aspergilosis invasora:		
Detección de galactomanano en enfermos oncohematológicos	II-A	33-35
Detección de galactomanano en otros enfermos inmunodeprimidos	II-B	28, 30, 31
Detección de otros Ag o componentes fúngicos	II-C	27, 36
Diagnóstico genérico de las micosis invasora:		
Detección de beta (1,3)-glucano	II-B	37, 38
Técnicas moleculares de diagnóstico de las micosis	II-B, II-C	39-45

Técnicas basadas en la detección de manano y anticuerpos antimanano. Existen varias comercializadas, como LA-*Candida* Detection System (Immuno Mycologics Inc.), ICON *Candida* Assay System (Hybritec Inc.) o Platelia *Candida* (Biorad)¹⁸. Sólo se ha evaluado con detalle la última y se fundamenta en la detección mediante ELISA de antígenos y anticuerpos de *Candida*. Las técnicas basadas en la detección de manano tienen una sensibilidad media del 40-50% y más del 95% de especificidad, mientras que las técnicas basadas en la detección de anticuerpos antimanano (50 y 94%, respectivamente). Cuando se utilizan las dos técnicas de forma combinada la sensibilidad alcanza el 80% y la especificidad el 93%^{19,20}. Para los pacientes con antigenemia positiva, la prueba de detección de manano tendría una aplicación adicional, que sería la monitorización de la respuesta al tratamiento. Aunque aparentemente la sensibilidad y especificidad son buenas, no hay que olvidar que en estos trabajos el estándar comparativo es el hemocultivo. Es decir, la utilización combinada de ambas técnicas diagnosticaría el 80% de las candidosis invasivas con hemocultivo positivo. Por todo ello, no existen evidencias que apoyen la instauración de estas técnicas en los laboratorios asistenciales. Antes de ello deben someterse a más estudios, con estratificaciones por tipo de enfermo y cuadro clínico, para conocer su utilidad real.

Detección de anticuerpos frente a los tubos germinales de C. albicans. Está a punto de comercializarse un test (*Candida albicans* IFA IgG, Vircell, España) para la detección de anticuerpos frente a los tubos germinales de *C. albicans*^{21,22}. Los estudios realizados por el propio equipo que ha desarrollado el método le auguran una buena sensibilidad para la detección de las candidiasis invasivas cuyo hemocultivo es negativo. La sensibilidad es mejor para *C. albicans*, pero también puede detectar infecciones invasivas por otras especies de *Candida*. La sensibilidad es menor en los grupos de pacientes con candidemia precoz, como los pacientes críticos. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba aumenta con el estudio seriado de los sueros de un paciente (dos sueros por semana). Puede considerarse por tanto una prueba complementaria al hemocultivo para la detección de la candidiasis invasiva.

Otras técnicas para el diagnóstico de las candidiasis invasivas. Existen otras pruebas basadas en la detección de antígenos diferentes al manano. De ellas la aglutinación con partículas de látex, Cand-Tec (Ramco Laboratories) y Pastorex (Biorad), fue de las primeras disponibles de forma comercial y ha sido utilizada ampliamente con resultados dispares. En general presenta baja especificidad y tampoco puede recomendarse de forma generalizada^{16,23}. La prueba para la detección de la enolasa se ha retirado del mercado y, por lo tanto, no puede ser recomendada²⁴. Por último, las pruebas preliminares de detección de D-arabinitol parecen prometedoras, pero hasta la fecha no existen técnicas aplicables a los laboratorios asistenciales²⁵.

Diagnóstico de la criptococosis mediante detección de antígeno capsular

La detección de antígeno criptocócico para el diagnóstico de la criptococosis es probablemente la mejor prueba basada en la detección de antígeno que se utiliza para el diagnóstico de una enfermedad infecciosa, por lo que debe estar disponible en cualquier laboratorio de microbiología. La prueba consiste en una aglutinación de partículas de látex y está comercializada por varias casas comerciales. Cualquiera de ellas aporta excelentes resultados de sensibilidad y especificidad cuando se siguen estrictamente las instrucciones del fabricante. Los falsos positivos son infrecuentes; pero es importante recordar la posibilidad de reacciones cruzadas con los polisacáridos del agar, por lo que es muy importante evitar la contaminación del líquido cefalorraquídeo (LCR) durante la siembra. Una cuestión interesante es la reacción cruzada que presenta esta prueba con los antígenos de *Trichosporon* spp. y de *Stomatococcus mucilaginosus*, lo cual también puede ocasionar resultados falsos positivos en la detección de antígeno criptocócico, en algunos pacientes con infecciones diseminadas por estos microorganismos²⁶.

Diagnóstico de la aspergilosis invasiva

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas que intentan diagnosticar precozmente la aspergilosis invasiva. Esta micosis muestra unos porcentajes de mortalidad del 50-90% según diferentes estudios, cifras que están relacionadas con la población estudiada y los problemas diagnósticos asociados con esta infección. Como en el caso de las pruebas para *Candida*, las pruebas para el diagnóstico de la aspergilosis se basan en la detección de componentes fúngicos. La detección de anticuerpos no ha demostrado utilidad práctica en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva²⁷.

Detección de galactomanano. Existe comercializado un test de ELISA tipo sándwich (Platelia *Aspergillus*®, Biorad) para la detección del galactomanano. Este método muestra una elevada sensibilidad cuando se realizan determinaciones seriadas, por lo que puede contribuir al diagnóstico precoz de la aspergilosis invasiva. La prueba se ha utilizado en muestras de suero, LCR, muestras respiratorias y orina^{27,28}, observándose valores dispares de sensibilidad y especificidad. Esto puede deberse a los diferentes criterios utilizados para definir los casos de aspergilosis probada, probable y posible; y a los diferentes tipos de población incluidos en el estudio (pediátrica, receptores de órgano sólido, receptores alogénicos)²⁹⁻³². Esta prueba ha demostrado su mayor utilidad en pacientes hematológicos considerados de alto riesgo de sufrir la infección^{33,34}, principalmente en receptores de quimioterapia con neutropenia de más de 10 días de duración y pacientes con trasplante alogénico de médula ósea. Sobre estos enfermos se ha realizado un estudio riguroso metodológicamente, en el que los pacientes se clasificaron según los criterios de la EORT/MSG y se realizaron necropsias de gran número de enfermos³⁵. Se practicó la detección de galactomanano en suero, dos veces por semana mientras duró el período de riesgo de aspergilosis, y la prueba se consideró positiva cuando la densidad óptica fue superior a 1. Además la detección de

galactomanano se consideró positiva cuando fueron positivos dos ELISA consecutivos. Con estos criterios y en este tipo concreto de población, la detección de galactomanano mediante ELISA tuvo una sensibilidad del 89,7% y una especificidad del 98,1% para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva, con valores predictivos positivo y negativo del 87,5 y 98,4%, respectivamente. Además existen datos sobre que esta técnica es útil para el seguimiento de la respuesta al tratamiento²⁹. Parece por tanto recomendable la utilización de la detección de galactomanano en estas condiciones y para este grupo de pacientes de alto riesgo. Para otros grupos de pacientes la prueba puede ser de utilidad, pero hasta el momento no existen estudios fiables que lo demuestren.

Otras técnicas para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva. No sólo se ha utilizado la detección de galactomanano para el diagnóstico de aspergilosis. Existen técnicas antigénicas basadas en la aglutinación, pero ninguna de ellas ha mostrado una buena sensibilidad³⁶. Por otro lado, la detección de anticuerpos frente *Aspergillus* es una técnica clásica para el diagnóstico de las infecciones por *Aspergillus*. Su mayor utilidad reside en el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar alérgica y aspergilomas en pacientes inmunocompetentes, por lo que no es eficaz para el diagnóstico de las infecciones en inmunodeprimidos, uno de los principales problemas de la micología médica actual²⁷.

Otras técnicas para el diagnóstico de las micosis

Existen métodos para la detección de un componente de la pared fúngica, el (1-3)- β -D glucano. Este glucano se encuentra presente en muchas especies fúngicas, por lo que su detección podría emplearse como técnica diagnóstica panfúngica. Por otra parte, este método no es eficaz para diagnosticar infecciones por algunos hongos como *C. neoformans* y otros *Basidiomycota* y por especies de *Zygomycota*. Existen técnicas comerciales como Fungitec G test (Seikagaku Kogyo Corporation), Wako WB003 test (Wako Pure Chemical Industries) y Glucatell (Acciusa Cape Cod) que han mostrado una sensibilidad del 90% y una especificidad del 85-100% en enfermos neutropénicos con micosis^{37,38}. Sin embargo, no se han evaluado con detalle mediante estudios multicéntricos estratificados, por lo que, aunque parecen prometedoras, no existen todavía evidencias sólidas como para recomendarlas como métodos aplicables en un laboratorio asistencial.

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 no estandarizadas para detectar ácidos nucleicos de levaduras y hongos miceliales. Habitualmente, se han amplificado las regiones ITS (*internal transcribed spacer*), 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%³⁹⁻⁴⁴. Por ello, las técnicas moleculares cuantitativas pueden ser de mayor utilidad para el diagnóstico de las

micosis. 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 bacterias y virus, por lo que probablemente pueda constituirse en una técnica de referencia para el diagnóstico de las micosis en un futuro no muy lejano⁴⁵.

Estudios de sensibilidad a los antifúngicos

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencias *in vitro* que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por otra parte, algunas 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 estrategias terapéuticas novedosas, la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica u otra^{46,47}.

Técnicas para realizar estudios de sensibilidad

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 M27-A2). Este método incluye técnicas de macro 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 de inhibición y recomendaciones para controlar la calidad de los resultados⁴⁸.

El documento M27-A2 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 NCCLS-like⁴⁷. Este es el caso del método propuesto por el *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) de la de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas⁴⁹. El estándar del EUCAST propone algunas modificaciones para determinar la CIM de las levaduras, acortando el periodo 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 sensibilidad⁵⁰.

En lo que se refiere a los hongos miceliales, el NCCLS también ha aprobado un método para realizar estudios de sensibilidad en hongos productores de conidias (documento M38-A⁵¹). En términos generales debe

indicarse que los estudios de sensibilidad en hongos miceliales se encuentran más retrasados que los de las levaduras, pues existen dudas sobre la aplicabilidad de este estándar para las especies que no producen conidias, así como si el medio de cultivo y el procedimiento de preparación del inóculo que se recomiendan son los más adecuados.

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^{47,52}.

Además, 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 comerciales que intentan simplificar los métodos de detección de resistencias.

Existen muchas clases de técnicas comerciales para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos, pero sólo una minoría ha demostrado una buena concordancia con los resultados de los métodos de referencia. Entre éstas destacan tres técnicas basadas en la microdilución marcada con contrastes colorimétricos, el Sensititre® YeastOne (Trek Diagnostic Systems), el ASTY® (ASTY Inc.) y el Fungitest® (Biorad). Estos métodos muestran una buena concordancia con los resultados obtenidos mediante los estándares del NCCLS y pueden constituir una alternativa para los laboratorios asistenciales^{47,53}. 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 han 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 clínica⁵⁴⁻⁵⁷. 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.

Por otra parte, las técnicas de sensibilidad a los antifúngicos muestran una discreta correlación *in vitro-in vivo*, correlación que es aún más baja en el caso de las micosis invasivas⁴⁷⁻⁵². Por ello, teniendo también en cuenta las limitaciones que se han expresado con anterioridad, los microbiólogos asistenciales se preguntan cuándo hay que realizar estos estudios de sensibilidad.

Indicaciones de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos

No existen indicaciones estrictas para hacer estudios de sensibilidad y las recomendaciones se basan en opiniones de expertos, conferencias de consenso y en algunos casos existen estudios controlados con una muestra reducida. Según estos datos, puede aceptarse que existen evidencias con un peso científico moderado (tabla 3) como para recomendar la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

Algunos autores recomiendan realizar estudios de sensibilidad en todas las cepas que proceden de infecciones invasivas o de enfermos con algún tipo de inmunosupresión. Esta recomendación se basa en el concepto de la vigilancia epidemiológica y en las evidencias que demuestran que los microorganismos resistentes a los antifúngicos se aíslan, con más frecuencia, en enfermos inmunodeprimidos que han sido tratados con antifúngicos en varias ocasiones⁵⁸. Sin embargo, pueden realizarse recomendaciones más concretas que, en ocasiones, puede ayudar al manejo de casos individuales.

Existen algunas situaciones en las que las pruebas de sensibilidad han demostrado tener utilidad (tabla 3). Entre éstas cabe destacar:

1. Casos de fracaso terapéutico.
2. Enfermos que han recibido profilaxis antifúngica previa.
3. Casos en los que se ha aislado una especie poco frecuente, de la 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^{3,47,59}.

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 se pueden establecer cuáles son los tratamientos iniciales más adecuados o si se debe cambiar 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

TABLA 3. Indicaciones de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos

Indicaciones	Grado de evidencia
Cepas procedentes de cualquier infección invasora	III-C
Cepas procedentes de enfermos inmunodeprimidos	III-C
Cepas procedentes de enfermos con fracaso terapéutico	II-B
Cepas procedentes de enfermos que han recibido profilaxis	II-B
Cepas pertenecientes a especies poco frecuentes	III-B
Estudios epidemiológicos	II-B

fluconazol, por lo que este fármaco es una buena opción para el tratamiento inicial de las candidemias⁶⁰. Sin embargo, si la cepa del hemocultivo se identifica como *C. krusei*, el tratamiento debe cambiarse, ya que esta especie es intrínsecamente resistente a fluconazol.

Por último, es conveniente hacer algunas recomendaciones técnicas sobre los estudios de sensibilidad. Como norma general debe indicarse que los estudios de sensibilidad tienen que realizarse con un método estandarizado (NCCLS, NCCLS-like o EUCAST), ya que estos métodos han mostrado una reproducibilidad elevada entre laboratorios y se han evaluado en estudios de correlación. Además, estas técnicas deberían realizarse en instituciones sanitarias que las realizaran rutinariamente, 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 cuya reproducibilidad no se haya analizado. Métodos como el Sensititre® y el Etest® han mostrado una buena correlación con los métodos de referencia y una elevada reproducibilidad, por lo que pueden ser útiles en los laboratorios clínicos, aunque sería aconsejable realizar estudios de comparación con los estándares, ya que de esta forma se podría conocer la fiabilidad de los resultados de los estudios de sensibilidad para cada institución sanitaria.

Bibliografía

- Ellis M. Invasive fungal infections: Evolving challenges for diagnosis and therapeutics. *Mol Immunol* 2002;38:947-7.
- Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22(Suppl 2):112-8.
- Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: Evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999;1:247-61.
- McGowan JE Jr, Chesney PJ, Crossley KB, LaForce FM. Guidelines for the use of systemic glucocorticosteroids in the management of selected infections. Working Group on Steroid Use, Antimicrobial Agents Committee, Infectious Diseases Society of America. *J Infect Dis* 1992;165:1-13.
- Asociación Española de Micología. Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología clínica. En: Peman J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editores. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2001.
- Richardson M, Ellis M. Clinical and laboratory diagnosis. *Hosp Med* 2000; 61:610-4.
- 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, Kanellou K, Mpantouraki M, Kanakoudi-Tsakalidou F. Case report. Hepatic abscesses due to *Aspergillus terreus* in an immunodeficient child. *Mycoses* 2001;44(9-10):415-8.
- 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.
- Ellis D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(Suppl 1):7-10.
- Meletiadi 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.
- Segal E, Elad D. *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. En: Ajello L, Hay RJ, editors. *Medical Mycology*. London: Arnold, 1998; p. 423-60.
- Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 1695-703.
- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3804-8.
- Bar W, Hecker H. Diagnosis of systemic *Candida* infections in patients of the intensive care unit. Significance of serum antigens and antibodies. *Mycoses* 2002;45:22-8.
- Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:147-50.
- Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-culture-based diagnostics. En: Calderone RA, editor. *Candida y Candidiasis*. Washington: ASM Press, 2002; p. 395-425.
- 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.
- Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:864-70.
- García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindós G, Álvarez A, Pontón J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997;35:3284-7.
- Quindós G, Pontón J, Cisterna R, Mackenzie DW. Value of detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:178-83.
- Lepper PM, Wiedek H, Geldner G, Essig A, Trautmann M. Value of *Candida* antigen and antibody assays for the diagnosis of invasive candidosis in surgical intensive care patients. *Intensive Care Med* 2001;27:916-20.
- Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD, Merz WG, Sánchez V, Maret SM, et al. Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med* 1991;324:1026-31.
- Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancoppe-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* 2000;38(Suppl 1): 147-59.
- Melcher GP, Reed KD, Rinaldi MG, Lee JW, Pizzo PA, Walsh TJ. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *J Clin Microbiol* 1991;29: 192-6.
- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310-50.
- Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:1912-4.
- 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.
- Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Liou B, Waller J, Campos F, et al. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002;20:1898-906.
- Siemann M, Koch-Dorfler M. The Platelia *Aspergillus* ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). *Mycoses* 2001;44:266-72.
- Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, De Maria A, Paola D, Van Lint MT, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1496-9.
- Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck 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.
- 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.

35. 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.
36. Machetti M, Feasi M, Mordini N, Van Lint MT, Bacigalupo A, Latge JP, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:917-21.
37. 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- > 3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal* 1997; 11:73-7.
38. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1- > 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995;345:17-20.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Mechanisms of fungal resistance: An overview. *Drugs* 2002;62:1025-40.
47. 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.
48. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA. 2002.
49. 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. Discussion Document 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany. 2003. En prensa.
50. 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* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3644-7.
51. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA. 2002.
52. 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.
53. 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.
54. Arian 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: Surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 2000;38(Suppl 1):173-82.
59. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781-803.
60. Cuenca-Estrella M, Rodero L, García-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.