



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Aspectos microbiológicos de la criptococosis en la era post-TARGA

Estrella Martín Mazuelos* y Ana Isabel Aller García

Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, España

RESUMEN

Palabras clave:
Criptococosis
TARGA
Sida

La criptococosis es una micosis que incrementó su incidencia considerablemente con la aparición del sida. Sin embargo, tras la instauración, a finales de los años noventa, del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), esta incidencia ha experimentado una disminución significativa, especialmente en los países desarrollados, aunque no ocurre lo mismo en los países en vías de desarrollo. Con la introducción del TARGA, no sólo se ha visto afectada la tasa de incidencia, sino también las manifestaciones clínicas, que se han presentado en algunos casos de forma anómala, como consecuencia de una recuperación de la inmunidad, describiéndose un nuevo síndrome, el síndrome inflamatorio de reconstitución inmune, así como manifestaciones raras como la linfadenitis y la afectación cutánea. Por otra parte, las pruebas de diagnóstico también han experimentado cambios, y existe un alto porcentaje de casos con cultivos negativos, microscopía negativa y detección tardía del antígeno criptocócico. En cuanto a los patrones de sensibilidad, también se ha observado una recuperación de la sensibilidad en la mayoría de los casos, hecho relacionado, a su vez, con la disminución de casos de criptococosis y con el menor uso de antifúngicos.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era

ABSTRACT

Keywords:
Cryptococcosis
HAART
AIDS

Cryptococcosis is a mycoses that increased considerably with the AIDS epidemic. However, with the introduction in the late 90's of the highly active antiretroviral therapy (HAART), this incidence has significantly decreased, especially in developed countries, in contrast with that of developing countries. The introduction of HAART not only has affected the incidence rate, but also the clinical presentation as a consequence of the immune recovery of the host, leading to the description of the so called immune reconstitution inflammatory syndrome. In addition, some rare clinical manifestations of cryptococcosis are currently shown, such as lymphadenitis and cutaneous involvement. Besides clinical presentation, diagnostic tests have also changed, with a high percentage of cases with negative cerebrospinal fluid (CSF) and blood cultures, negative direct CSF microscopy, and delayed antigen positive results. Antifungal susceptibility patterns have also changed towards a recuperation of susceptibility, which is related to the decrease in both the incidence of cryptococcosis and less use of antifungal agents.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La criptococosis es una enfermedad infecciosa generalmente sistémica que afecta a los animales y a los humanos. Puede afectar a individuos inmunocompetentes, pero se manifiesta con más frecuencia y de forma más severa en los pacientes inmunodeprimidos. El factor de riesgo más importante es la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)^{1,2}. Hasta la aparición de la epidemia de sida, era una micosis de baja frecuencia (< 1.000 casos por año en Estados Unidos)^{2,3}, que afectaba, principalmente, a enfermos de leucemia, linfomas y otros procesos causantes de inmunodepresión. Con la aparición del sida en la década de 1980, se observó un dramático incremento de esta micosis, y la infección pasó a ser una

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: e.martinmazuelos.sspa@juntadeandalucia.es (E. Martín Mazuelos).

de las infecciones oportunistas más frecuentes en personas con este síndrome^{2,4}, presentándose de forma grave en estos enfermos, especialmente en aquellos cuyos linfocitos CD₄ estaban por debajo de 100 células/mm³. La prevalencia de la criptococosis en pacientes con sida al comienzo de la epidemia era del 2-10% en Europa Occidental y Estados Unidos, mientras que en el continente africano y el sudeste asiático superaba el 15%^{1,2}. Durante la década de 1990, la incidencia de esta infección disminuyó de forma significativa en los países desarrollados, en un principio debido a la introducción de los azoles en el tratamiento de estos enfermos y, posteriormente, debido a la introducción de los nuevos tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA), bajando la incidencia en Estados Unidos de 4,9 a 0,2-0,9 casos/10⁵ habitantes^{5,6}. En España esta disminución fue del 47,8% (0,67 casos/10⁶ habitantes en 1996 a 0,35/10⁶ habitantes en 1998)⁷. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, como los de África y el sudeste asiático, esta micosis sigue causando una morbilidad y una mortalidad elevadas².

La criptococosis está causada por levaduras encapsuladas redondas u ovales (3,5-5 µm) pertenecientes al género *Cryptococcus*, que incluye alrededor de 50 especies, de las que sólo *C. neoformans* y *C. gattii* se consideran patógenos humanos, por ser las únicas capaces de crecer a 37 °C, aunque existen referencias en la bibliografía de otras especies (*C. laurentii*, *C. albidus* y *C. curvatus*) que, ocasionalmente, han producido enfermedad en el ser humano, especialmente en los inmunodeprimidos². Con la utilización masiva de la terapia antirretroviral (TARGA), no sólo ha disminuido la frecuencia de esta micosis, sino que también ha provocado cambios significativos en las manifestaciones clínicas y en los resultados de las pruebas de diagnóstico de laboratorio^{2,6}.

Micología, epidemiología y manifestaciones clínicas

Las levaduras del género *Cryptococcus* se reproducen por gemación única o múltiple, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija, poseen una cápsula de naturaleza polisacárida (mayoritariamente, galactoxilmanano y manoproteína) que le confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis, y cuyo tamaño varía dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura. Por regla general, las cepas en la naturaleza y en los medios de cultivo son pobremente encapsuladas, mientras que, en los tejidos, suelen mostrar una gran cápsula. La cápsula se puede observar mediante un examen en fresco con tinta china, tinción negativa que tiñe toda la preparación excepto la cápsula. Se considera un factor importante de patogenicidad y, según la composición, se pueden diferenciar distintos serotipos: A (*C. neoformans* var *grubii*), D (*C. neoformans* var *neoformans*) y AD (*C. neoformans*) y los serotipos B y C (*C. gattii*).

Crece muy bien en todos los medios de cultivo, formando colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es muy variable: crema, ocre, rosa o amarillo, virando a tonos más oscuros con la edad del cultivo. Las cepas que poseen una cápsula muy pequeña forman colonias similares a las del género *Candida*. Entre sus componentes de la pared celular está un polisacárido compuesto por 1,6-β-D-glucopirano y β-1,3-α-glucano, compuestos responsables de la relativa resistencia a las equinocandinas y de la baja utilidad del β-D-glucano como marcador biológico en el diagnóstico de esta infección^{2,10}. Tienen metabolismo aerobio, por lo que son levaduras no fermentadoras, producen ureasa y utilizan el inositol como única fuente de carbono.

La de levadura es la forma anamórfica de ambas especies que se encuentra en muestras clínicas y ambientales. *In vitro*, en el laboratorio, se ha desarrollado la fase teleomorfa o sexual, que se reproduce por basidioconidias que son de diferente tamaño y forma, según la especie: *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans*) produce basidioconidias en cadenas y son esféricas, mientras que *F. bacillispora* (*C. gattii*) son alargadas, de forma bacilar².

C. neoformans es un hongo de distribución universal, que se aísla con facilidad del medio ambiente, principalmente del suelo contaminado con excrementos secos de palomas y otras aves, debido al alto contenido en creatinina de las excretas, que le sirve como fuente de nitrógeno, en donde puede permanecer viable hasta 2 años en ausencia de radiaciones solares. *C. gattii* se ha encontrado en zonas tropicales y subtropicales en distintas especies de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*, *Eucalyptus rudis*, etc.) y en los koalas de Australia. Recientemente, se ha encontrado esta especie en muestras ambientales en algunas zonas del Canadá, en los estados norteamericanos de Washington y Oregón, y en otras áreas geográficas, asociado a infecciones en individuos sanos, lo que sugiere un cambio importante en la epidemiología de esta especie^{7,10}. En nuestro país se han aislado los serotipos A, D y AD de pacientes humanos, el más predominante de los cuales es el A (86% de los casos), mientras que el D y el AD se han encontrado en menor proporción (22,7%)⁷. El serotipo B se ha encontrado en animales, en muestras ambientales y, recientemente, en humanos⁹. No se ha encontrado ninguna cepa del serotipo C en nuestro medio.

A pesar de que las heces de paloma son la fuente más importante de infección, estos animales no padecen la enfermedad (por su alta temperatura corporal, 41-43 °C, y por su flora intestinal), y la adquisición en el ser humano se produce por vía respiratoria. Hasta hace poco no se conocían casos de transmisión aérea interpersonal, aunque sí a través de órganos trasplantados, pero recientemente se han descrito casos de infección nosocomial persona-persona y de madre-hijo. Todavía no se conoce ningún caso de transmisión directa de los animales al ser humano².

La infección se adquiere por inhalación de las levaduras desecadas (< 3 µm) existentes en la naturaleza. La patogenicidad viene determinada por la cápsula, que impide la fagocitosis, y la actuación del complemento, así como por la enzima feniloxidasas, que contribuye al especial neurotropismo del hongo. Cuando el criptococo llega a los alvéolos pulmonares, se desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del hospedador, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección. Según los modelos experimentales, la resistencia a la infección parece que depende de la activación de los macrófagos alveolares y neutrófilos por parte de los linfocitos más sensibilizados, y además es necesaria una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes. Debido a que los pacientes más susceptibles a la infección por este hongo presentan una alteración a uno o ambos tipos de respuesta inmune, el microorganismo no es eliminado cuando penetra en las vías respiratorias. Así, progresa hacia el pulmón y se disemina por vía hematogena hasta el sistema nervioso central (SNC) –la localización más frecuente– y produce cuadros de meningitis o meningoencefalitis, esta última de peor pronóstico, aunque menos común. Las manifestaciones clínicas variarán en función del tipo de enfermo. La aparición de la enfermedad suele ser aguda en pacientes con sida, en tratamiento con corticoides o que sufren neoplasias hematológicas, mientras que, en los restantes, suele presentarse de una forma más crónica. La mayoría de los pacientes presentan signos y síntomas inespecíficos de fiebre, malestar general, confusión, rigidez de nuca moderada o nula, y cefalea. La evolución es lenta, con aparición de meningismo sólo en el 30% de los casos. La meningitis puede ser crónica, similar a la tuberculosa. Existen diferencias en la presentación de la meningitis en los pacientes con sida, variando en función de la menor duración de los síntomas, coexistencia de otras infecciones oportunistas, pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR), grado de hipertensión intracraneal, mortalidad asociada (75-100%, sin tratamiento), etc. También hay variaciones en la rentabilidad del cultivo de las distintas muestras. Es importante que el médico mantenga una alta sospecha de esta enfermedad para así poder llegar al diagnóstico. En pacientes inmunocompetentes infectados por *C. gattii* y, excepcionalmente, por *C. neoformans*, pueden presentarse tumoraciones cerebrales únicas,

llamadas criptococomas, sin meningitis, difíciles de diferenciar de un tumor o tuberculoma^{1,2}.

Respecto a la localización pulmonar, en los pacientes inmunocompetentes, la afectación puede progresar, regresar espontáneamente o permanecer estable durante largos períodos de tiempo, siendo raro que haya síntomas. Suele aparecer sola, aunque a veces puede coexistir con otras manifestaciones extrapulmonares. En los pacientes inmunodeprimidos, la afectación puede oscilar de asintomática a grave. Sólo el 5-25% de los enfermos de sida presentan tos y disnea, y en pocas ocasiones existe dolor pleural y alteraciones radiológicas. La mortalidad puede llegar al 42% en este tipo de pacientes^{1,2}. En los casos de coinfecciones por otros microorganismos oportunistas (citomegalovirus, *Nocardia*, micobacterias), la mortalidad puede llegar al 100%^{1,2}.

La afectación cutánea, que aparece en el 10% de los pacientes con sida y criptococosis diseminada, puede generar lesiones similares a las producidas por el virus del *Molluscum contagiosum*, especialmente en el cuello y la cabeza. Se han descrito casos de endocarditis, endoftalmitis, pielonefritis, artritis, osteomielitis, afectación ganglionar y prostatitis. Se ha demostrado que la próstata puede ser un reservorio de *C. neoformans* y constituir la causa de las recidivas en pacientes aparentemente tratados con éxito con anfotericina B. Menos del 10% de los enfermos con sida presentan funguemias aisladas. En raras ocasiones, ciertas lesiones extraneurales pueden estar originadas por la inoculación directa de esta levadura, incluyendo la linfadenitis esporotricoides, la queratitis o la peritonitis relacionada con la diálisis peritoneal.

Lo expuesto anteriormente son las manifestaciones clásicas de la infección criptocócica, pero en la era post-TARGA, estas manifestaciones pueden ser muy diferentes, quizá por la rápida recuperación de la inmunidad que origina una desproporcionada respuesta a los antígenos capsulares, provocando una respuesta inflamatoria local anormal denominada síndrome inflamatorio de reconstitución inmune, que a su vez da lugar a manifestaciones atípicas del SNC. La meningitis se manifiesta de forma aguda con dolor y con inflamación de los tejidos en una criptococosis silente; otras localizaciones, como la linfadenitis y manifestaciones cutáneas⁶, también son frecuentes. Un síndrome parecido se ha observado en pacientes con criptococosis relacionada con un trasplante de órgano sólido¹¹.

Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil, ya que las formas de presentación son inespecíficas, al igual que las pruebas analíticas habituales, por lo que el diagnóstico definitivo es el microbiológico. Debe seleccionarse la muestra adecuada (LCR, sangre, secreciones del tracto respiratorio, piel, etc.), según el foco de infección^{1,2}.

Examen microscópico

- Tinción de tinta china: se basa en la utilización de tinta china comercial, que no penetra la cápsula y tiñe toda la preparación de negro excepto la cápsula del criptococo. Se realiza en sedimento del LCR y orina. Su sensibilidad es del 50% en pacientes sin sida y del 80% en individuos con sida y meningitis criptocócica. Los falsos negativos se deben a un bajo número de criptococos (< 10³ unidades formadoras de colonias [UFC]/ml) y a cepas con cápsulas muy pequeñas. Los falsos positivos son por confusión con otras levaduras de los géneros *Rhodotorula* y *Candida*, y de otras especies de *Cryptococcus*, e incluso con bacterias como *Klebsiella*, artefactos o linfocitos. Es la técnica más rápida de todas las disponibles para el diagnóstico y, además, evidencia la carga de levaduras de la muestra; esto último es interesante, ya que un alto inóculo se relaciona con un mayor riesgo de presión intracraneal aumentada.
- Tinción de calcoflúor: es una tinción fluorescente que, aunque no es específica de *C. neoformans*, puede utilizarse en muestras no lí-

quidas con bajo número de levaduras¹². Es rápida, pero se necesita personal especializado y el empleo de un microscopio de fluorescencia.

- Tinciones habituales, como la de azul de metileno de Loeffler, azul de toluidina, o la de Wright, que pueden ser útiles para la observación de levaduras.
- Tinciones histopatológicas, como la de la metenamina-plata de Grocott o la del ácido peryódico de Schiff (PAS), que permiten identificar *C. neoformans* por el tamaño y la gemación con base estrecha, pero que no detectan la cápsula en muestras histológicas.
- Tinción de Fontana-Mason, que permite identificar las cepas con poca cápsula tiñendo la pared de color marrón o negro.
- Otras tinciones para la observación de la cápsula son la de azul de Alcian y la de mucicarmina de Mayer.

Cultivo e identificación

Establece el diagnóstico definitivo. El medio de cultivo habitual es el agar Sabouraud dextrosa sin cicloheximida, en el que crece la levadura al cabo de 48-72 h de incubación, a temperatura no más alta de 35 °C, en aerobiosis. Los cultivos negativos deben seguirse durante 30 días, especialmente en pacientes que están en tratamiento². En el caso de la criptococemia, el hemocultivo resulta positivo en el 50% de los casos. El método de lisis-centrifugación y, sobre todo, los sistemas automatizados usados en los laboratorios de microbiología para las bacterias son los más sensibles, y estos últimos presentan menos contaminaciones^{2,12}. En las muestras de orina y secreciones bronquiales de pacientes con sida, que suelen estar contaminadas con *Candida* que enmascaran el crecimiento de *Cryptococcus*, pueden utilizarse medios de cultivo diferenciales como el agar *niger seed* que diferencia las colonias marrones de *Cryptococcus* de las blancas de *Candida*, por la capacidad del primero de degradar el ácido caféico a melanina, o bien el agar inositol con cloranfenicol que favorece el crecimiento de *Cryptococcus*. e inhibe a *Candida*².

La identificación se hace por métodos convencionales de asimilación y fermentación de azúcares. Las levaduras de *Cryptococcus* no fermentan los azúcares, asimilan el inositol, reducen los nitratos a nitritos, hidrolizan la urea y producen fenoloxidasas, que se pone de manifiesto en el medio *niger seed*. Las dos especies de criptococo se diferencian entre sí por una serie de características: crecimiento a 37 °C (*C. neoformans* es la única especie que crece a 37 °C, mientras que *C. gattii* crece débilmente), asimilación del ácido málico, fumárico, D-prolina y D-triptófano (*C. gattii* lo asimila, *C. neoformans* no), asimilación de la creatinina (*C. gattii* no lo asimila y *C. neoformans* sí). Además, aunque ambas especies producen ureasa, ésta puede ser inhibida por EDTA en *C. gattii*. Tanto el medio de cultivo canavanina-glicina-azul de bromotimol, como el medio glicina-cicloheximida rojo fenol, pigmentan las colonias de *C. gattii* de color azul y rojo, respectivamente, diferenciándolas de las de *C. neoformans*^{2,10}.

En la actualidad hay métodos alternativos comerciales basados en pruebas bioquímicas, automatizados o semiautomatizados, como Microscan Yeast Identification Panel (Siemens Healthcare), Vitek2 Yeast system card, API 20C y 32C (bioMérieux), RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic System) y Uni Yeast Tek (Remel), que en 24-48 h identifican la mayor parte de las levaduras patógenas, entre ellas el criptococo. La identificación también se puede realizar mediante la detección de ADN por un sistema comercial Accuprobe (Gen Probe, Ca), con un 100% de sensibilidad y especificidad^{7,8}.

Detección del antígeno capsular

Se puede detectar con técnicas de aglutinación de látex, usando anticuerpos policlonales, o anticuerpos monoclonales anti-glucuronoxil-manano. Es una técnica específica y sensible. Se usa para el LCR y también puede ser útil para otras muestras (sangre, orina y secreciones respiratorias). Se han descrito falsos positivos (factor reuma-

toide, *Trichosporon beigelii*, *Capnocytophaga carnisosus*, enfermos con bacteriemia o neoplasia). También se conocen falsos negativos relacionados con un fenómeno de prozona, que puede corregirse con tratamiento con pronasa. La sensibilidad de la prueba en pacientes con sida llega casi al 100% en LCR, y al 97% en suero. Sin embargo, en este tipo de enfermos se han descrito cepas con poca cápsula en los que la concentración de antígeno puede ser anormalmente baja. Un suero positivo > 1/4 indica infección; si el título es $\geq 1/8$, indica enfermedad activa. La prueba puede ser positiva antes que el cultivo. A mayor título, mayor gravedad de la enfermedad, y la caída de los títulos indica un buen pronóstico. En pacientes con sida, éstos son mucho más altos en LCR ($\geq 1/1.024$). La cuantificación del antígeno es útil para conocer el pronóstico de la enfermedad: un título $\geq 1/1.024$ indica un mal pronóstico, con un alto inóculo de levaduras, una baja respuesta inmune y una mayor posibilidad de fracaso terapéutico; mientras que si es menor, el pronóstico mejora y el éxito terapéutico aumenta^{7,8}. La detección del antígeno en el suero y el LCR es muy específica y más sensible que la microscopia y el cultivo, y puede ser la única prueba positiva cuando se usa de cribado, o para el diagnóstico precoz. Su detección establece el diagnóstico, aunque hay que intentar aislar el hongo en cultivo para confirmar el diagnóstico y para poder hacer estudios de susceptibilidad *in vitro*.

Al igual que en la clínica, con la instauración del TARGA en los pacientes con sida, también se han observado hallazgos anómalos en las pruebas diagnósticas de laboratorio, como pueden ser los cultivos negativos repetidos en estos pacientes, quizá explicado por la eliminación rápida de las levaduras del lugar de la infección debido a la buena respuesta inmune. Los exámenes microscópicos directos también pueden ser negativos, mientras que la detección de antígeno capsular, aunque puede ser positiva, tarda más tiempo en positivizarse (3-16 semanas). La mayoría de estos casos se diagnostican por la histopatología, que también es tardía, especialmente en las formas anormales de presentación clínica⁶.

Diagnóstico por biología molecular

Podría ser una alternativa útil para el diagnóstico de la criptocosis, debido a las limitaciones que tienen las técnicas convencionales, como pueden ser la falta de sensibilidad de la microscopia, la lentitud de los cultivos, e incluso los falsos negativos que ocurren en los pacientes de la era post-TARGA, con falsos positivos y negativos de la detección del antígeno capsular. Las técnicas de biología molecular podrían paliar estos inconvenientes y, en este sentido, hay estudios recientes¹² que refieren una sensibilidad y una especificidad buenas de estas técnicas en muestras de LCR, respiratorias y de orina. Sin embargo, en este campo queda camino por andar hasta que se estandaricen estas técnicas y puedan aplicarse de forma rutinaria en un laboratorio clínico.

Técnicas para la determinación de la sensibilidad en *C. neoformans*

Uno de los principales problemas para evaluar la sensibilidad de *C. neoformans* a los antifúngicos es la falta de un método estandarizado y de puntos de corte específicos para esta levadura. Aunque se aplican los mismos métodos y los mismos puntos que para *Candida*, sin embargo no deberían extrapolarse a *C. neoformans* debido a la naturaleza fastidiosa de este microorganismo, a su lento crecimiento y a los escasos estudios de correlación entre los datos *in vitro* e *in vivo*. Aunque la incidencia de la criptocosis en los pacientes con sida ha disminuido desde la introducción de los TARGA^{5,6}, la publicación de trabajos que describen la aparición de resistencia a la anfotericina B, la 5-fluorocitosina y el fluconazol¹³⁻¹⁶ justifica la necesidad de disponer de técnicas adecuadas para la selección de la terapia específica en el tratamiento y la profilaxis de la infección criptocócica.

Método de referencia

El método de referencia más utilizado es la técnica de microdilución en caldo, descrita por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), en diversos documentos publicados a lo largo de los años (M27-P, 1992; M27-T, 1995; MP27-A, 1997; M27-A2, 2002; M27-A3, 2008)¹⁷, que establece unas normas estandarizadas para la realización de pruebas de sensibilidad de levaduras a los diferentes antifúngicos. Estos documentos recogen para *C. neoformans* unas modificaciones propuestas por Ghannoum et al¹⁸, que consisten en utilizar un medio de cultivo diferente, el *Yeast Nitrogen Base* tamponado a pH 7 (YNB 7), y un inóculo mayor (10^4 UFC/ml). El método del CLSI¹⁷ establece los medios y los puntos de corte que deben utilizarse para los diferentes antifúngicos y *Candida*, pero no para *C. neoformans*. Para este microorganismo, no existe una unificación de criterios, y se han publicado estudios que emplean tanto la metodología estándar¹⁷ como la que recoge las modificaciones de Ghannoum¹⁸. Hasta el momento, la mayoría de los autores extrapolan los puntos de corte del CLSI descritos para *Candida* a *C. neoformans*. Existen pocos estudios que traten de establecer una correlación de los resultados de sensibilidad *in vitro* de *C. neoformans* con la respuesta *in vivo*. En este sentido, Witt et al¹⁹ y Jessup et al²⁰, utilizando la metodología del CLSI¹⁷ con las modificaciones descritas por Ghannoum¹⁸, observan una correlación entre los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de *C. neoformans* a fluconazol y el fracaso terapéutico. Nuestro grupo de estudio¹⁵, utilizando la misma metodología, obtuvo resultados similares, encontrando que la respuesta clínica a la terapia de mantenimiento con fluconazol fue mejor en los pacientes con valores bajos de CMI (< 16 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, debería haber más estudios para poder correlacionar estos datos *in vitro* con la respuesta clínica.

Métodos comerciales

Debido a la complejidad que presenta el método de referencia para poder utilizarse en los laboratorios de microbiología clínica, se han desarrollado diferentes métodos comerciales que, aunque son más fáciles de realizar, en el caso de *C. neoformans* presentan las mismas limitaciones que las ya expuestas para la técnica de microdilución del CLSI¹⁷.

Técnicas de difusión en agar

El Etest[®] es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por bioMérieux. Hay distintos estudios publicados utilizando este sistema²¹⁻²³, aunque incluyen un número bajo de aislamientos de *C. neoformans*. En general, los valores de CMI obtenidos con este método tendían a ser más bajos que los obtenidos con la técnica de referencia y, en el caso de los azoles, la presencia de microcolonias en torno a la elipse dificultaba la lectura de la CMI. Sin embargo, Maxwell et al²⁴, utilizando una serie más amplia (162 aislamientos clínicos de *C. neoformans*), encontraron valores de CMI más elevados. Al igual que con el método de referencia, son pocos los estudios que relacionan los valores de CMI de *C. neoformans* a los diferentes antifúngicos, obtenidos por Etest con la respuesta clínica. Lozano-Chiu et al²⁵ realizaron un estudio con cepas de *C. neoformans* resistentes a anfotericina B, utilizando el método de la microdilución M27-A, el Etest, y tres medios de cultivo (RPMI 16540, Antibiótico n.º 3 e YNB). Estos autores detectan las cepas resistentes a anfotericina B con ambos métodos utilizando el medio Antibiótico n.º 3, mientras que el método de Etest también detectaba las cepas resistentes usando el medio RPMI. Aller et al²³ hallaron que, en las cepas de *C. neoformans* aisladas en los episodios en los que existía la evidencia clínica de fracaso al tratamiento con fluconazol, la CMI obtenida por el Etest era mayor que en los casos con respuesta. Estos datos se contraponen con los publicados por Dannaoui et al²⁶.

En el año 2004, el CLSI publicó la normativa para realizar la determinación de la sensibilidad a *Candida* spp. a diferentes antifúngicos mediante la técnica de difusión en disco (documento M44-A)²⁷. Este método, si bien ha demostrado ser eficaz para *Candida* y los azoles, en el caso de *C. neoformans* hay pocos estudios que lo avalen^{28,29}. Recientemente³⁰ se ha estudiado también las tabletas de Neo-sensitabs® (Rosco Diagnostica, Dinamarca); sin embargo, el número de cepas de *C. neoformans* ensayado ha sido muy bajo.

Otros métodos

El panel de microdilución *Sensititre-Alamar YeastOne* (Westlake, Estados Unidos) es un método comercial basado en la técnica de microdilución del CLSI que lleva incorporado un reactivo colorimétrico (azul de Alamar). Esta técnica se ha evaluado igualmente para determinar la sensibilidad de *C. neoformans*^{31,32}. En general, los valores de CMI obtenidos con este método son inferiores a los obtenidos con el método de referencia. Con el fluconazol se obtuvo una correlación del 80%. Para la anfotericina B se obtuvieron los índices más bajos de correlación. Este método puede ser útil para la determinación de la sensibilidad a *Candida*, aunque de momento no hay suficientes estudios que avalen su utilidad para *C. neoformans*.

Evolución de los patrones de sensibilidad de *C. neoformans* en la era post-TARGA

Como ya hemos comentado, la falta de un método estandarizado y la inexistencia de un punto de corte específico para este microorganismo dificulta el poder realizar una comparación rigurosa entre los distintos estudios publicados. Existen trabajos publicados en los que los autores no encuentran cambios significativos en los patrones de sensibilidad de este microorganismo desde la introducción de los TARGA³³⁻³⁵. En otros, por el contrario, encuentran un incremento de la sensibilidad a la 5-fluorocitosina³⁶ y al fluconazol^{36,37}. Estos datos son diferentes a los obtenidos en nuestro país por Perkins et al³⁸, que detectan unas tasas de resistencia a la anfotericina B del 5,3%, al fluconazol del 46,6% y a la 5-fluorocitosina del 41,3%, permaneciendo estos valores de CMI estables durante la década estudiada (1995-2004). Estas discrepancias podrían deberse a que, al proceder las cepas ensayadas de un centro de referencia, probablemente eran cepas de pacientes con infecciones recidivantes y que habían recibido antifúngicos durante largos períodos de tiempo. Por otra parte, Datta et al³⁹, en la India, y Sar et al⁴⁰, en Camboya, hallaron incrementos de los valores de CMI al fluconazol. Existen dos factores que podrían estar relacionados con este hecho, y que a su vez están ligados a la situación socioeconómica de estos países: por un lado, el uso frecuente o indiscriminado del fluconazol y, por otro, la falta de acceso a los TARGA. En efecto, el menor uso de agentes antifúngicos en pacientes infectados por el VIH-1 tratados con TARGA ha hecho que disminuya la incidencia de criptococosis y ha contribuido a la disminución de cepas resistentes especialmente al fluconazol³⁶. Según nuestra experiencia, existió un incremento de los valores de CMI en los pacientes que presentaron recidivas y fueron tratados con fluconazol^{15,37}, datos que no coinciden con los publicados por Capoor et al⁴¹ en la India.

La mayoría de los estudios publicados se han realizado con cepas de *C. neoformans*, aunque también existen estudios que comparan la sensibilidad de *C. neoformans* y *C. gattii*⁴²⁻⁴⁴. Hay publicaciones que muestran un patrón de sensibilidad similar entre las dos especies⁴². Trilles et al⁴³ describen que *C. gattii* fue más sensible a los azoles, a diferencia de Gómez-López et al⁴⁴, que obtienen valores más altos de CMI para el fluconazol en las cepas de *C. gattii*. En definitiva, no parece existir acuerdo entre los diferentes autores.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Martín-Mazuelos E, Torres Rodríguez JM. Criptococosis. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, eds. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid: Panamericana; 2006. p. 625-9.
- Viviani MA, Tortorano AM. Cryptococcus En: Anaisie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, eds. Clinical mycology. Nueva York: Churchill Livingstone; 2009. p. 231-49.
- Graybill JR, Sobel J, Saag M, van Der Horst C, Powderly W, Cloud G, et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. Clin Infect Dis. 2000;30:47-54.
- Crowe SM, Carlin JB, Stewart KI, Lucas CR, Hoy JF. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. J Acquir Immune Defic Syndr. 1991;770-6.
- Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, et al. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. Clin Infect Dis. 2003;36:789-94.
- Manfredi R, Calza L, Chiodo F. AIDS-associated *Cryptococcus* infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems. Int J Antimicrob Agents. 2003;22:449-52.
- Abruzzo GK, Flattery AM, Gill CJ, Kong L, Smith JG, Krupa D, et al. Evaluation of water-soluble pneumocandin analogs L-733560, L-705589, and L-731373 with mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1077-81.
- Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis. 2005;41:654-9.
- Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009 (En prensa).
- Singh N, Lortholary O, Alexander BD, Gupta KL, John CT, Pursell K, et al. An immune reconstitution syndrome-like illness associated with *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients. Clin Infect Dis. 2005;40:1756-61.
- Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2002;16:837-74.
- Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. Med Microbiol. 2009;58:1098-105.
- Powderly WG, Keath EJ, Sokol-Anderson M, Robinson K, Kirk D, Little JR, et al. Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. Infect Dis Clin Pract. 1992;1:314-6.
- Armengou A, Pocar C, Mascaro J, García-Bragado F. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. Clin Infect Dis. 1996;23:1337-8.
- Aller AI, Martín-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, et al. Correlation of fluconazole XMI with clinical outcome in cryptococcal infection. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1544-8.
- Kantarcioğlu AS, Yücel A. A flucytosine-resistant *Cryptococcus neoformans* (serotype D) strain isolated in Turkey from cutaneous lesions. Med Mycol. 2002;40:519-23.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Ghannoum MA, Ibrahim AS, Fu Y, Shafiq MC, Edwards JE, Cridle RS. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdilution technique. J Clin Microbiol. 1992;30:2881-6.
- Witt MD, Lewis RJ, Larsen A, Milefchik E, Leal MA, Haubrich RH, et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. Clin Infect Dis. 1996;22:322-8.
- Jessup CJ, Pfaller MA, Messer A, Zhang J, Tumberland M, Mbidde EK, et al. Fluconazole susceptibility testing of *C. neoformans*: comparison of two microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients. J Clin Microbiol. 1998;36:2874-6.
- Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparisson of Etest with National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1995;33:535-40.
- Pfaller MA, Messer SA, Karlsson A, Bolmstrom A. Evaluation of Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. J Clin Microbiol. 1998;36:2586-9.
- Aller AI, Martín-Mazuelos E, Gutierrez MJ, Bernal S, Chavez M, Recio FJ. Comparison of Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. J Antimicrob Chemother. 2000;46:997-1000.
- Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 2003;41:97-9.
- Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. J Antimicrob Chemother. 1998;36:2817-22.
- Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Neguyen A, Piens MA, Favel A, et al. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2464-70.

27. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Document M44-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
28. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the NCCLS M44 P Disk Diffusion Method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole. *J Clin Microbiol.* 2004;42:380-3.
29. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Velesov AV, et al. Results of ASTEMIS DISK global antifungal surveillance study: a 6.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5848-59.
30. Espinel-Ingroff A, Cantón E, Gibbs D, Wang A. Correlation of NeoSensitabs tablet diffusion assay results on three different agar Media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2007;45:858-64.
31. López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM, Mendez-Vazquez R, Ribas-Forcadell E, Modera-Lopez Y, Baro-Tomas T, et al. In vitro susceptibility of *C. neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:645-9.
32. Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramirez E. In vitro susceptibilities to yeasts using ATB FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:658-61.
33. Brandt ME, Pfaller MA, Hajjrd RA, Hamill J, Pappas PG, Ringold AL, et al. Trend in antifungal susceptibility of *C. neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3065-9.
34. Yildiran ST, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. In vitro susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of *C. neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592). *Mycoses.* 2002;45:378-83.
35. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole and fluconazole against 4169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;48:201-5.
36. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *C. neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol.* 2005;43:2163-7.
37. Aller AI, Claro R, Castro C, Serrano C, Colom MF, Martín-Mazuelos E. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. *Chemotherapy.* 2007;53:300-5.
38. Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Rates of antifungal resistance among clinical isolates of *C. neoformans* var. *neoformans*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:1144-7.
39. Datta K, Jain N, Sethi S, Rattan A, Cassadevall A, Banerjee U. Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care centre in India: a need for care. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:683-6.
40. Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:563-5.
41. Cappor MR, Mandal P, Deb M, Aggarwal P, Banerjee U. Current scenario of cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. *Mycoses.* 2008;51:258-65.
42. Thompson GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallo AV, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:309-11.
43. Trilles L, Fernandez-Torres B, Lazera Mdos S, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4815-7.
44. Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Martins DA, Melhem C, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:727-39.