



Ponencias



Estandarización de los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Cálculo de los puntos de corte clínicos y puntos de corte epidemiológicos

Emilia Cantón

Centro Investigación, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

Correspondencia: Emilia Cantón. Laboratorio Infección Grave. Avenida Fernando Abril Martorell, n.º 101 Torre A. Planta 1. 46026 Valencia. E-mail: canton.emi@gva.es

Los ensayos de sensibilidad deben ser vistos como parte del proceso para predecir la respuesta al tratamiento. En su realización deben utilizarse métodos estandarizados. En la actualidad, disponemos de varios métodos estandarizados: los publicados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y los del Comité Europeo (EUCAST). Ambos utilizan el método de microdilución en caldo. El CLSI publicó su primer documento para las pruebas de sensibilidad a las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans* en el año 1992 (M27-P) y el definitivo en 2008 (M27-A). Para hongos filamentosos, el primer documento se publicó en el año 1998 (M38-P) y en 2004 el definitivo (M38-A). El CLSI tiene también estandarizado el método de difusión en disco para levaduras y hongos filamentosos, documentos M44-A y M51-A, respectivamente.

Los métodos estandarizados han sido estudiados exhaustivamente para determinar la reproducibilidad, intra e interlaboratorio, de cada uno de sus parámetros: disolventes, medio de cultivo, pH, temperatura y tiempo de incubación, inóculo, antifúngicos, diluciones y concentraciones de los mismos, lectura, definición de concentración mínima inhibitoria (CMI) y, lo más importante, la interpretación de los resultados, lo que se conoce también como puntos de corte clínicos. Otra utilidad de los métodos estandarizados es que sirven de referencia para el desarrollo de otros métodos más sencillos de realizar. En cada fase de la estandarización se requiere que al menos intervengan 8 laboratorios, a los que se les envía todo el material. Cada laboratorio realiza las pruebas de sensibilidad por triplicado y en 10 días diferentes.

Los puntos de corte clínicos separan los aislamientos sensibles (susceptibles de responder al tratamiento) de los resistentes (no responden al tratamiento). Se determinan basándose en la correlación *in vitro-in vivo*, a partir de los resultados terapéuticos y CMI determinada por el mismo método de referencia en un grupo homogéneo de pacientes; además, se tienen en cuenta los mecanismos de

resistencia al antifúngico, la farmacocinética y la farmacodinamia de los mismos, entre otros.

El punto de corte epidemiológico (PCE) se define como la concentración más elevada que separa la población salvaje (WT) (sin ningún mecanismo de resistencia) de los aislamientos con algún mecanismo de resistencia, no pertenecientes a la población salvaje (non-WT). Se determina a partir de los datos de la CMI de al menos tres laboratorios y con los datos de más de 100 aislamientos para cada especie. Por especie y laboratorio se requiere los datos de un mínimo de 10 aislamientos, además de enviar los resultados de las cepas control de calidad. Las CMI deben determinarse por el mismo método estandarizado. Con todo ello se calcula la distribución de las CMI de cada laboratorio y la general, la simetría de las mismas y el valor modal, y se hace un ajuste estadístico.

La principal utilidad de los ECV son: vigilancia epidemiológica de la resistencia, identificación de posibles aislamientos con mecanismos de resistencia y la orientación al clínico cuando no se dispone de puntos de corte clínicos (como en el caso de los hongos filamentosos).

Metagenómica: del microbioma al micobioma

Ana Alastruey-Izquierdo

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

Correspondencia: Ana Alastruey-Izquierdo.

E-mail: anaalstruey@isciii.es

El microbioma humano es la colección de microorganismos que viven en el cuerpo. Se estima que de media hay 10 veces más células microbianas que humanas en el cuerpo, aunque suponen únicamente entre el 1 y el 3% de la biomasa total. Estos microorganismos generalmente no son patógenos. Numerosos estudios han demostrado su papel esencial en el funcionamiento del organismo, ya que participan en diferentes procesos, como la degradación de alimentos, la regulación del sistema inmunitario, en la respuesta a infecciones crónicas inflamatorias, así como en el control de microorganismos patógenos.

El microbioma humano es muy variable; su composición cambia dependiendo de la parte del cuerpo, e incluso puede cambiar en una misma persona a lo largo del tiempo (en respuesta a diversos factores, como, por ejemplo, el uso de antibióticos). Estudios recientes han relacionado cambios en la composición del microbioma con el desarrollo de distintas enfermedades y,

por tanto, cada vez hay un mayor interés por este campo. El avance tecnológico y el desarrollo de nuevas herramientas de secuenciación han supuesto una revolución en el campo de la genómica, lo que ha favorecido el desarrollo y el abordaje de ambiciosos proyectos en el campo de la metagenómica. Así, en los últimos años se han publicado numerosos artículos en los que se estudia el microbioma humano. La mayoría de estos estudios se han centrado en bacterias, pero cada vez hay más estudios en los que se estudia el microbioma (hongos) donde se pone de relevancia su importante papel en la microbiota humana.

Dermatofitos: forma y DNA

F. Javier Cabañes

Grupo de Micología Veterinaria, Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

Correspondencia: F. Javier Cabañes. Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales. UAB. Bellaterra, Barcelona, España. Teléfono: +34 935811749.

Fax: +34 935812006. E-mail: javier.cabanes@uab.es

En 1990, Hawksworth [4], en un momento de su discurso presidencial en la Sociedad Micológica Británica, puntualizaba cómo iba a utilizar el término hongos: «... "hongos" se utiliza en el sentido ciertamente arbitrario aunque tradicional de "organismos estudiados por los micólogos", con el fin de abarcar a aquellos que ahora están incluidos en otros reinos...». En esa década, la forma está dejando paso al DNA. El análisis del DNA en los hongos se está popularizando debido, en parte, a la mayor accesibilidad de las técnicas moleculares como la PCR y al diseño de cebadores universales para hongos [6]. En esta conferencia comentaremos brevemente cómo han influido estos cambios en algunas especies de dermatofitos. Los dermatofitos son un grupo de hongos relacionados filogenéticamente que causan las dermatofitosis. La taxonomía tradicional de los dermatofitos se ha basado en la forma, fundamentalmente en criterios morfológicos microscópicos relacionados con la fase de reproducción asexual (anamorfo) de estos hongos. Los géneros que agrupan a las especies productoras de dermatofitosis son *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* [1]. Evolutivamente, algunas de estas especies se han adaptado a determinadas especies animales y pueden presentar diferentes hábitats. Las especies antropófilas, como *T. rubrum* o *E. floccosum*, son aquellas que se limitan a causar dermatofitosis en el hombre y raramente infectan a otros animales. No obstante, el hombre puede presentar infección por especies zoófilas, como *M. canis* o *T. verrucosum*, que característicamente producen dermatofitosis en distintos animales. También existen especies geófilas como *M. gypseum*, que presentan su hábitat normal en los suelos y pueden producir tiñas tanto en el hombre como en los animales. No obstante, existen especies que presentan una morfología común con los dermatofitos, como *Microsporum cookei* o *Trichophyton ajelloi*, que no se han descrito como agentes etiológicos de dermatofitosis, o sus descripciones como tales son dudosas. Estas especies son denominadas por algunos autores como «tipo dermatofito» o dermatofitoides. Si bien no se conoce la fase sexual (teleomorfo) de la mayoría de estos hongos ascomicetos, pertenecen a la clase Eurotiomycetes, orden Onygenales, familia Arthrodermataceae, y se incluyen en un único género denominado *Arthroderma*.

La forma y el DNA han contribuido de forma distinta como caracteres útiles en la definición de especie en los distintos dermatofitos. Dos ejemplos contrapuestos que, en este sentido, podemos destacar son el de las especies filogenéticamente próximas *T. tonsurans* y *T. equinum*, y el del complejo de especies de *T. mentagrophytes*. Cuando se iniciaron los primeros estudios de los dermatofitos con

técnicas de análisis del DNA, *T. tonsurans* y *T. equinum* fueron puestas en sinonimia debido a que sus diferencias en las secuencias de los ITS rDNA eran mínimas [2], lo que creó una considerable confusión. Actualmente, siguen considerándose dos especies distintas ya que presentan, entre otras características, diferente morfología, fisiología y ecología. No obstante, hay que tener en cuenta que estas dos especies han presentado en estudios filogenómicos un grado muy elevado de sintenia (92%) [5]. Estos resultados confirmarían que son dos especies que han divergido recientemente. En el caso del complejo *T. mentagrophytes*, la forma no nos permite discriminar las diferentes especies que engloba (*T. anamorfo* de *A. benhamiae*, *T. equinum*, *T. interdigitale* y *T. mentagrophytes*), lo que hace recomendable el uso de técnicas de análisis del DNA para poderlas diferenciar [3].

Según la nomenclatura dual admitida antes de 2013 por el Código Internacional de Nomenclatura para las algas, los hongos y las plantas (ICN), un único género, *Arthroderma*, incluiría todas las especies. Este nombre tenía prioridad sobre los nombres de los géneros de los anamorfos y definía al holomorfo. En la práctica, esta prioridad ha sido poco utilizada en la nomenclatura de estos hongos. A partir de 2013, el ICN no admite la nomenclatura dual y un único nombre debe definirse para un determinado hongo. En el caso de los dermatofitos y de los hongos relacionados con ellos este tema está por definir. Esto dará, sin duda, nuevas oportunidades a nombres ya utilizados en este tipo de hongos como *Nannizzia* o *Keratinomyces*.

Bibliografía

- Emmons CW. Dermatophytes. Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. Arch Derm Syph. 1934;30:337-362.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. Med Mycol. 1999;37:315-330.
- Gräser Y, Scott J, Sumerbell R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. Mycopathologia. 2008;166:239-256.
- Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycol Res. 1990;95:641-655.
- Martinez DA, Oliver BG, Gräser Y, Goldberg JM, Li W, Martinez-Rossi NM, et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. mBio. 2012;3: e00259-12.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-322.

Nuevas técnicas para el diagnóstico de las dermatofitosis

Antonio Rezusta, Sonia de la Fuente, M. Ángeles Ruiz y Ana López Calleja

Grupo IIS Aragón, Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

Correspondencia: Antonio Rezusta. Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet. C/Padre Arrupe, s/n. Zaragoza, España. Teléfono: +34 976765542. Fax: +34 976765541. E-mail: arezusta@unizar.es

Los hongos dermatofitos (HD) son responsables de una amplia variedad de infecciones de piel, uñas y pelo. Su identificación es con frecuencia complicada y requiere un tiempo largo de respuesta y micólogos con amplia experiencia.

En el proceso diagnóstico de las infecciones por HD hay que tener en cuenta que no hay una tendencia unánime a la hora de solicitar la realización del diagnóstico micológico, como refleja el estudio del observatorio europeo, ya que hay autores que no lo consideran necesario. Si se establece la necesidad de realizarlo, un elemento fundamental es el tipo de muestra incluida y cuándo hacer el diagnóstico. Así, el diagnóstico de *tinea pedis* puede evitar un problema mucho más difícil de corregir, *tinea unguium*, que puede aparecer hasta 15 años después. Por otro lado, no estudiar los contactos en *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton soudanense* o *Microsporum audouinii* supone con frecuencia un diagnóstico incompleto que puede llevar a fallos terapéuticos.

Cuando se realiza el diagnóstico micológico se observa que no hay un acuerdo sobre cuál es el «gold standard»; es normalmente el cultivo el considerado como tal, pero también el estudio por anatomía patológica mediante tinción con ácido periódico de Shiff es otra opción considerada.

Nuestro criterio es que el diagnóstico micológico es necesario y, una vez tomada esta decisión, hay aspectos importantes que debemos tener en cuenta.

Muestra a recoger. ¿Solo uña del pie? Mejor acompañada de toma de piel del pie. ¿Solo al paciente centinela? Mejor tener en cuenta los contactos, especialmente si puede tratarse de HD antropófilos.

Método a utilizar para la detección. Observación directa, cultivo, observación microscópica, reacción en cadena de la polimerasa (mayor sensibilidad, mayores costes en personal y en dinero), espectrofotometría de masas (poca experiencia).

Taxonomía. La propuesta por Gräser incluye varias especies bajo la denominación de *Trichophyton rubrum*, y el Atlas de de Hoog et al. excluye *T. soudanense*. La taxonomía publicada en un libro tan referente a nivel internacional como el libro de la Sociedad Americana de Microbiología incluye la última especie nombrada.

Identificación clásica. Está basada en la morfología macro y microscópica; pueden existir limitaciones por la experiencia del microbiólogo con solo unas pocas especies.

Identificación por espectrofotometría de masas. Presenta dificultades ya que las bases disponibles no permiten la identificación de varias especies y no presenta resultados comparables a los obtenidos con las bacterias. En los datos publicados no hay un acuerdo sobre el método de realización: sin extracción, con ácido fórmico, con extracción proteica. . . El método de extracción es importante.

Reacción en cadena de la polimerasa. Normalmente, presenta una mayor sensibilidad que el cultivo y, según la metodología, mayor o menor sensibilidad que la observación microscópica.

Identificación por secuenciación. Especies como *T. soudanense* y *T. rubrum* son indistinguibles por este método. Además, pueden dar lugar a especies nuevas que son difíciles de diferenciar por la morfología.

Observación al microscopio electrónico de barrido. Permite establecer diagnósticos de dermatofitosis en casos con cultivo negativo.

Microscopia confocal. Se trata de una herramienta útil.

Establecimiento de la acreditación. Los requisitos generales deben ajustarse a la Norma ISO 15189, con el fin de garantizar la calidad de los resultados.