

En este control se remitió una cepa de hongo levaduriforme para realizar la identificación y la sensibilidad a los antifúngicos, si se consideraba pertinente. Procedía de una muestra de líquido cefalorraquídeo de un paciente con alteraciones neurológicas y una lesión ulcerosa con fondo necrótico y evolución tórpida, localizada en el dorso de la mano. Había sido intervenido por un cáncer de colon unos meses antes. Era diabético y, como antecedentes epidemiológicos, destacaba el ser cuidador de palomas.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

El laboratorio que actuaba de referencia en este control identificó la cepa como *Cryptococcus neoformans* mediante el examen morfológico, pruebas bioquímicas (ureasa, VITEK y API ID32C) y aglutinación con partículas de látex. Los resultados del estudio de sensibilidad a los antifúngicos, por diferentes métodos, se expresan en la tabla 1.

Tabla 1. Sensibilidad a los antifúngicos según el laboratorio de referencia

	MDB-YNB ^a (µg/ml)		MDB-RPMI ^b (µg/ml)		SYO ^c (µg/ml)		E-test® (µg/ml)		DA ^d (mm)	
	48 h	72 h	42 h	72h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Anfotericina B	0,5	1	0,25	0,25	0,06	0,12	0,012	0,023	23	23
Fluconazol	2	4	8	8	4	8	2	3	40	46
Itraconazol	0,12	0,12	0,12	0,12	0,03	0,03	0,016	0,023	40	40
5-fluorocitosina	0,25	0,5	1	1	2	4	0,032	0,25	50	56

^aMDB-YNB: Método de microdilución en caldo con medio YNB siguiendo las normas del NCCLS.

^bMDB-RPMI: Método de microdilución en caldo con medio RPMI 1640 siguiendo las normas del NCCLS.

^cSYO: Sensititre YeastOne (Izasa)

^dDA: Difusión en agar en medio Shadomy (Rosco, Izasa)

La lectura de la CMI se realizó a las 48 y 72 horas en todos los métodos. El laboratorio de referencia no interpreta la categoría clínica de los resultados, ya que no existen todavía criterios normalizados.

El control se envió a 169 laboratorios, de los cuales 161 remitieron la respuesta, lo que supone un porcentaje de participación del 95,3%. De los 161 participantes que contestan, 150 (93,2%) identifican a la cepa como *C. neoformans*, coincidiendo con el laboratorio de referencia, lo cual supone un porcentaje de identificación muy elevado. La tabla 2 resume los resultados de identificación.

Tabla 2. Resultados de identificación de la cepa

Identificación	Número	%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	150	93,2
Género <i>Cryptococcus</i>	6	3,7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	1,2
Género <i>Candida</i>	2	1,2
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	0,6
Total	161	100,0

Hay 18 laboratorios (11,2%) que no especifican el método utilizado para la identificación. Entre los 143 restantes hay 64 (39,7%) que emplean un solo método o criterio de identificación (tabla 3). Es más frecuente que se combinen dos o más métodos (49,1%).

Tabla 3. Identificación utilizando un único método

Método	Número	%
--------	--------	---

API 20C AUX (bioMérieux)	18	28,1
Microscan (Dade)	10	15,6
API ID 32C (bioMérieux)	9	14,1
Vitek (bioMérieux)	7	10,9
Candifast (Oxoid)	3	4,7
Auxacolor (Pasteur)	3	4,7
Pruebas bioquímicas	3	4,7
Tinta china	2	3,1
Rapid ID (Izasa)	2	3,1
Manual	2	3,1
API (no especificado)	2	3,1
Otros	3	4,7
Total	64	100,0

En el caso de los laboratorios que utilizan más de un método de identificación las combinaciones son numerosas. La prueba de la tinta china suele formar parte de la mayoría de ellas (en 62 de los 79 participantes), por lo general acompañando a los sistemas comerciales de identificación. La prueba de la ureasa también se utiliza con frecuencia (en 28 ocasiones).

El método comercial más utilizado ha sido el API (bioMérieux) en 72 laboratorios (44,7%), seguido del Vitek y Microscan en 14 cada uno (8,7%) y Auxacolor en 15 (9,3%). Sólo un laboratorio que utiliza un método API no llega a ninguna identificación, concluyendo en su informe que se trataba de una levadura del género *Candida*. Los laboratorios que identifican la cepa como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* utilizaron métodos comerciales, API 32ID C, Vitek y Auxacolor. De los seis que sólo identifican el género, tres utilizaron métodos manuales (examen microscópico, tinta china, pruebas bioquímicas y características del cultivo), dos Auxacolor y uno la galería API 20C AUX.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD

Realizaron el antifungigrama 70 laboratorios, lo que supone un porcentaje del 44,5%. En 16 centros se llevó a cabo mediante la técnica disco-placa (22,9%). Las marcas de discos más usadas fueron Rosco (Izasa), en 7 centros y Pasteur en 4. El resto de los participantes determinó la CMI o una aproximación, ya que usaron métodos comerciales con pocas diluciones, cercanas a hipotéticos puntos de corte. Los marcas utilizadas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4.- Métodos de sensibilidad cuantitativos

Marca comercial	Número	%
Fungitest (Pasteur)	17	31,5
Sensititre (Izasa)	14	25,9
ATB-Fungus (bioMérieux)	12	22,2
E-Test® (AB-Biodisk)	5	9,3
Candifast (Oxoid)	3	5,6
Manual (Microdilución)	1	1,9
Sin especificar	2	3,7
Total	54	100,0

La mayoría de los participantes realizan pruebas de sensibilidad que ofrecen resultados cualitativos (Sensible, Intermedio, etc.) utilizando las galerías comerciales Fungitest, ATB-Fungus o Candifast, que enfrentan la levadura a dos concentraciones distintas del antifúngico. Merece la pena destacar que estos centros llevan a cabo la correspondiente interpretación de sus resultados, a pesar de no estar definidos los criterios de punto de corte. Informan la CMI de la cepa los participantes que utilizan métodos como E-Test® o Sensititre, lo que supone un 27,1% respecto del total de los que hacen el antifungigrama. En la tabla 5 se resumen los resultados cualitativos de la sensibilidad a los antifúngicos con independencia del método utilizado.

Tabla 5. Distribución de los resultados cualitativos de sensibilidad a los antifúngicos

Antifúngico	Número	Sensible Cuali/Cuanti ^a	Intermedio Cuali/Cuanti ^a	Resistente Cuali/Cuanti ^a	SI ^b
-------------	--------	---------------------------------------	---	---	-----------------

Anfotericina B	70	34/32	–	–	4
5-fluorocitosina	68	31/26	1/3	1/3	3
Ketoconazol	59	32/22	1/1	– /1	2
Fluconazol	57	24/20	2/4	1/2	4
Itraconazol	45	17/23	1/	–	4
Miconazol	33	23/10	–	–	–
Nistatina	19	15/3	–	1/–	–
Econazol	17	14/3	–	–	–
Clotrimazol	4	4/0	–	–	–

^aCuali: Sin informar datos numéricos de CMI/ Cuanti: informe cuantitativo de CMI

^bSI: laboratorios que remiten la CMI sin interpretar de forma cualitativa el resultado.

Merece la pena volver a destacar que, aunque no se hayan definido los criterios estándar de sensibilidad y resistencia por parte de organismos normalizadores, como el NCCLS, la mayoría de los participantes no hagan referencia a este hecho y lleven a cabo una interpretación cualitativa. Tampoco se hace mención al tiempo de lectura del antifungigrama que, como se observa con los datos del centro de referencia, tiene una gran influencia sobre la CMI obtenida.

Al analizar los resultados para cada antifúngico se observa que existe una gran variabilidad en los resultados de las CMI informadas. En las tablas 6 a 11 se exponen los datos de CMI aportados por los distintos laboratorios participantes.

Tabla 6. Distribución de las CMI de anfotericina B

CMI (µg/ml)	Sensible	No interpretada
0,016	1	–
0,03	5	1
0,06	5	–
0,125	3	1
0,19	1	–
0,32-0,47	1	–
0,5	1	1
<1	4	–
<2	9	–
2	1	–
<4	1	–
4	–	1
<8	1	–
Total	33	4

Aunque existen pocos datos sobre la resistencia clínica de *C. neoformans* a la anfotericina B, algunos autores consideran (ver artículo de revisión adjunto) que puede correlacionarse con valores de CMI iguales o superiores a 0,8 µg/ml. Así pues, no tendría sentido utilizar métodos comerciales cuya menor concentración fuese del orden de más de dos veces el mencionado punto de corte (v.g., resultados del tipo ≤ 2 µg/ml, ≤ 4 µg/ml, etc.). No obstante, la mayor parte de los laboratorios coinciden con los datos aportados por el laboratorio usado como referencia, en términos generales.

Tabla 7. Distribución de las CMI de 5-fluorocitosina

CMI (µg/ml)	Sensible	Intermedio	Resistente	No interpretada
<0,25	2	–	–	–
0,25	1	–	–	1

0,5	3	-	-	1
1	4	-	-	-
<2	6	-	-	-
2	5	-	-	-
4	2	-	-	1
<5	1	-	-	-
>2 - <32	-	1	-	-
>5 - <32	-	1	-	-
8	-	1	-	-
<32	1	-	-	-
<128	1	-	-	-
>32	-	-	3	-
Total	26	3	3	3

Tabla 8. Distribución de las CMI informadas para el fluconazol

CMI (µg/ml)	Sensible	Intermedia	Resistente	No interpretada
0,75	-	-	-	1
<2	7	-	-	-
2	1	-	-	1
1	4	-	-	-
4	5	-	-	-
<8	7	-	-	-
8	3	1	-	-
>8	-	1	-	-
>8- <64	-	1	-	-
16	-	1	-	1
48- 64	-	-	1	-
128	-	-	-	1
>256	-	-	1	-
Total	20	4	2	4

Por lo que respecta al fluconazol, la mayoría de los laboratorios coinciden en las CMI informadas con los valores obtenidos por el laboratorio de referencia. Sólo seis informan una CMI superior a 8 µg/ml (valor aportado por el centro de referencia). La resistencia clínica a fluconazol se asocia a CMI iguales o superiores a 16 µg/ml (ver revisión adjunta). Los participantes que obtienen CMI elevadas intentan reflejar este criterio.

Tabla 9. Distribución de las CMI informadas para el ketoconazol

CMI (µg/ml)	Sensible	Intermedia	Resistente	No interpretada
0,016	3	-	-	1
0,03	3	-	-	-
0,06	1	-	-	-
0,125	4	-	-	-

0,25	2	-	-	-
<0,5	5	-	-	-
0,5	1	-	-	-
>0,5	-	1	-	-
<1	2	-	-	-
8	-	-	-	1
>8	1	-	-	-
>32	-	-	1	-
Total	22	1	1	2

Tabla 10. CMI informadas para el itraconazol

CMI (µg/ml)	Sensible	No interpretada
0,008	1	-
0,016	2	-
0,03	3	-
0,04	-	1
0,06	4	-
0,08	-	1
0,125	4	1
<0,5	7	-
0,5	2	-
8	-	1
Total	23	4

Tabla 11. Distribución de las CMI de miconazol

CMI (µg/ml)	Sensible
<0,5	5
0,5	1
<1	3
>8	1
Total	10

Ningún participante ha utilizado un laboratorio externo de referencia para la identificación de la cepa, si bien cuatro refieren que la remitirían a un centro especializado para la realización del antifungigrama, aunque esta prueba no fue informada por estos participantes.

Sólo 31 laboratorios hacen comentarios; en 6 casos, informando de que han realizado el antifungigrama en un laboratorio de referencia. Otros 7 comentan que no hacen antifungigrama (se asume que debido a que no está justificado ni normalizado). Un sólo centro hace un acertado comentario al respecto, argumentando explícitamente que no está indicada actualmente su realización.

Los comentarios referidos a la elección del tratamiento son escasos. La mayoría de los participantes emplearían anfotericina B y 5-fluorocitosina y uno propone anfotericina B o fluconazol. Un centro comenta que sería razonable descartar que el paciente sea seropositivo para el VIH.

A modo de resumen, es de destacar que, en este control, los laboratorios han optado por realizar una identificación con un sistema comercial complementado con pruebas sencillas, como el examen con tinta china, la morfología y la prueba de la ureasa, lo que les ha llevado, en la mayoría de los casos, a identificar correctamente la cepa. Como sugerencia de los responsables del Programa de Control de Calidad, con aplicación más general, habría que reflexionar antes de utilizar cualquier método comercial de antifungigrama. Es necesario saber si éste puede aportar datos con valor significativo, por ejemplo, si el intervalo de concentraciones incluye un hipotético punto de corte. Más importante aún es asegurarse que se han establecido criterios de

interpretación para ese microorganismo.