

CONTROL DE CALIDAD DE MICOLOGÍA (M-1/03)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa caracterizada por el laboratorio de referencia como *Candida albicans*. Se acompañaba de un supuesto clínico de un varón de 25 años de edad que había sido diagnosticado de sida en el periodo previo a la existencia de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia (TARGE). Durante cuatro años, este paciente había sido tratado con uno o dos fármacos. La respuesta fue insatisfactoria, con progresión de su enfermedad que se manifestó en forma de infecciones oportunistas. Una de estas complicaciones fue la candidiasis orofaríngea, que motivó la administración de fluconazol. Ante la respuesta parcial, a medida que su enfermedad progresaba, con sucesivas recaídas, se le administraron dosis crecientes del antifúngico, hasta 400 mg/día, que fue el momento en que se aisló la(s) levadura(s) objeto del control. Por fin, el paciente tuvo la oportunidad de ser tratado con un régimen TARGE, lo que se tradujo en una muy buena respuesta virológica, inmunológica y clínica, y en última instancia permitió prescindir de la profilaxis secundaria frente a complicaciones infecciosas, incluida la candidiasis. A este respecto, el paciente presentaba unas condiciones óptimas para el desarrollo de la resistencia a los azoles.

Se solicitó a los participantes la identificación de la cepa remitida y la realización del estudio de sensibilidad con los antifúngicos oportunos, así como la formulación de comentarios libres que se considerasen convenientes. En esta ocasión, la organización del Control de Calidad remitió a la mitad de los participantes una cepa que había adquirido resistencia al fluconazol y a la otra mitad una sensible. Se iniciaba así una nueva experiencia del Programa que trata de evitar el intercambio de información entre participantes. Además, este caso ilustraba la segregación de poblaciones de levaduras, común en el curso del tratamiento prolongado con antifúngicos azólicos.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a 228 laboratorios de los que 203 remitieron la hoja de respuesta, todas ellas evaluables. El porcentaje de participación fue del 89,0%, similar al de otros controles. Como se puede observar en la tabla 1, todos los participantes identificaron adecuadamente el género, encontrándose las escasas diferencias en la identificación de especie, como cabría esperar dado el reducido nivel de dificultad. Así, el 97,5% informó *C. albicans*. Las otras especies identificadas fueron *Candida tropicalis* (2 ocasiones), y *Candida dublinensis*, *Candida parapsilosis* y género *Candida* en una ocasión, respectivamente. El control de calidad sólo consideró como válida la identificación de *Candida albicans*. Por otro lado, se obtiene el crecimiento de un segundo aislado en tan sólo una ocasión en la que se informan dos cepas diferentes de *C. albicans* ambas sensibles a los azoles. Por parte del control fueron revisados todos los lotes de liófilos antes de realizar el envío, no encontrándose contaminación en ninguno de ellos.

Tabla 1. Resultados de la identificación micológica.

Identificación	Número	%
<i>Candida albicans</i>	198	97,5
<i>Candida tropicalis</i>	2	1,0
<i>Candida dublinensis</i>	1	0,5
<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,5
Género <i>Candida</i>	1	0,5
Total	203	100,0

En la identificación micológica, la gran mayoría de los participantes no informa de la estructura observada (97,0%), el 1,5% informa levaduras y el 1,5% restante clamidosporas, estructura observada tras someter al cultivo a las condiciones adecuadas. En cuanto a los métodos empleados en la identificación, las pruebas bioquímicas, en su mayoría sistemas comerciales (API, Microscan, Vitek, etc.), fueron utilizadas por 148 participantes (72,9%) y de forma exclusiva por el 45,3%. Usaron métodos manuales (cultivo y prueba de filamentación) 105 laboratorios (51,7%). Hay un 9,4% que dice utilizar sólo el cultivo con medios cromógenos. El 7,4% únicamente informa la prueba de filamentación, aunque previamente han debido obtener la colonia a partir de un cultivo en medio Sabouraud, por lo que se incluyen en el apartado de cultivo+filamentación. Por último, el 3,0% no informa del método empleado. Los resultados con las diferentes combinaciones se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

Métodos	Número	%
Pruebas bioquímicas	92	45,3
Cultivo + filamentación + pruebas bioquímicas	40	19,7
Cultivo + filamentación	27	13,3
Cultivo + pruebas bioquímicas	16	7,9
Cultivo en medios cromógenos	19	9,4
Manual sin especificar	3	1,5
No informa del método empleado	6	3,0
Total	203	100,0

En la tabla 3 se especifican las marcas y sistemas comerciales utilizados para la identificación. Algunos participantes informaron más de un sistema, por lo que en algún caso se analiza más de una marca por laboratorio. Las

diversas galerías bioquímica API (API no especificado, API 20C auxonograma, API Id 32C y API Yeast) fueron, en su conjunto, el sistema más empleado (53,9%). Le siguen en frecuencia las marcas de placas de cultivo cromogénicas (agar *Candida* Id®, Chromagar® *Candida* y placas de marca no especificada) con un 19,4%. El sistema Microscan es usado en el 6,1% de las ocasiones, el Vitek YBC en el 8,3%, el Vitek-2 en el 5,0% y la galería Auxacolor (BioRad) en el 5,5%. Respecto a las identificaciones discordantes obtenidas, los tres participantes que informan género *Candida*, *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis* utilizan métodos manuales y los dos que identifican *C. tropicalis* usan el sistema API 20C auxonograma de bioMérieux.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	%
Galerías API (bioMérieux)	97	53,9
API 20C auxonograma	52	28,9
API Id 32C	34	18,9
API no especificado	5	2,8
API Yeast	6	3,3
Microscan (Dade-Behring)	11	6,1
Vitek YBC (bioMérieux)	15	8,3
Vitek 2	9	5,0
Auxacolor (BioRad)	10	5,5
Chromagar <i>Candida</i> (BBL)	20	11,1
Placa cromogénica no especificada	10	5,5
Agar <i>Candida</i> Id (bioMérieux)	5	2,8
Candifast (Oxoid)	2	1,1
Rapid Yeast Plus System (IZASA)	1	0,5
Total	180	100,0

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a todos los centros que realizaron dichas pruebas. El 36,0% (73 laboratorios) no realizaron estudio de sensibilidad, por lo que no han sido objeto de análisis por parte de control. Entre estos participantes, unos comentan que remitirían la cepa a un laboratorio de referencia, otros que no consideran oportuna la realización de dichas pruebas y otros no especifican la causa. Así pues, el número de respuestas analizables fue de 130 (64,0%) y los datos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Métodos empleados en el antifungigrama.

Método	Número	%
CMI ^a	58	44,6
CMI + E-test®	5	3,8
Concentraciones críticas	38	29,3
Disco-placa	13	10,0
Disco-placa + E-test®	1	0,8
E-test®	7	5,4
No especificado	8	6,1
Total	130	100,0

^aCMI por microdilución.

Como puede observarse, la tendencia mayoritaria fue a utilizar el método de microdilución en caldo (CMI y concentraciones críticas), usado en total por 101 laboratorios (77,7%). La determinación de la CMI mediante E-test® fue realizada por 13 participantes, lo que supone un 10,0% del total y como método único por el 5,4%. El método de disco-placa se utilizó en 14 de los laboratorios y de forma exclusiva en el 10,0%.

En la tabla 5 se informan las marcas empleadas para la realización del antifungigrama. En total se analizan 101 respuestas. El sistema más utilizado fue Sensititre (57,4%), seguido por Fungitest (22,8%) y ATB-fungus (11,9%). El 4,0% de los participantes no ofrece información sobre la marca utilizada, el 3,0% usa el Candifast y el 1,0% realiza un método de microdilución manual.

Tabla 5. Marcas empleadas en el antifungigrama.

Marca	Número	%
Sensititre (IZASA)	58	57,4
Fungitest (BioRad)	23	22,8
ATB-fungus (bioMérieux)	12	11,9
Candifast (Oxoid)	3	3,0
Manual	1	1,0
No especifican	4	4,0
Total	101	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica suministrados por el centro que actuó como laboratorio de referencia se corresponden a las dos cepas diferentes de *C. albicans*, la primera con resistencia a los azoles y la segunda sensible. La lista se incluye como término de comparación para los participantes, sin que suponga una recomendación de uso en el tratamiento de las infecciones por este hongo. Los datos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de la cepa según el laboratorio de referencia.

Antifúngico	<i>C. albicans 1</i>		<i>C. albicans 2</i>	
	CMI	Interpretación	CMI	Interpretación
Anfotericina B	0,25	S	0,25	S
Fluconazol	256	R	≤0,125	S
Itraconazol	16	R	0,03	S
Ketoconazol	16	R	≤0,008	S
5-Fluorocitosina	0,125	S	≤0,03	S
Voriconazol	16	NI	≤0,008	NI

^aCMI expresada en µg/ml.

Las respuestas de los laboratorios variaron desde aquéllos que no refieren pruebas de sensibilidad a otros que estudian varios antifúngicos pero luego sólo informan al clínico una selección de éstos. El número de antifúngicos informados por los laboratorios se ajusta bastante a las necesidades terapéuticas (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, anfotericina B, voriconazol y 5-fluorocitosina).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

En la tabla 7 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad para cada uno de los antifúngicos informados por los laboratorios. En total, se han recibido resultados correspondientes a 12 antifúngicos diferentes, de los que relacionamos 10.

Tabla 7. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antifúngicos.

Antifúngico	Número	Interpretación ^a			
		No interpretado	Sensible	I / SDD ^b	Resistente
Fluconazol	111	1 (0,9)	90 (81,1)	2 (1,8)	18 (16,2)
Ketoconazol	108	4 (3,7)	77 (71,3)	9 (8,3)	18 (16,7)
Itraconazol	97	1 (1,0)	76 (78,3)	4 (4,1)	16 (16,5)
Voriconazol	46	7 (15,2)	32 (69,6)	–	7 (15,2)
Miconazol	41	–	25 (61,0)	5 (12,2)	11 (26,8)
Econazol	22	–	13 (59,1)	2 (9,1)	7 (31,8)
Clotrimazol	8	–	7 (87,5)	–	1 (12,5)
Nistatina	28	–	28 (100,0)	–	–
Anfotericina B	123	6 (4,5)	115 (93,5)	1 (0,8)	1 (0,8)
5-Fluorocitosina	114	4 (3,5)	108 (94,7)	–	2 (1,7)

^aLos números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antifúngico.

^bI/SDD: intermedio/sensibilidad dosis-dependiente.

Analizados los resultados de los participantes desde un punto de vista general, hay una notable disparidad de resultados, sobre todo en lo referente a la interpretación de los azoles, esto es debido a que se remitieron dos cepas diferentes de *C. albicans* como ya se ha comentado anteriormente. Atendiendo a los resultados, son más los laboratorios que realizan estudio de sensibilidad a los azoles de la cepa sensible que de la cepa resistente. Cabe destacar la uniformidad de los resultados y de interpretación de las sensibilidades del resto de los antifúngicos, exceptuando el voriconazol para el que todavía no existen criterios normalizados de interpretación. En particular, hay que señalar que el 100% de los laboratorios consideran que la cepa es sensible a nistatina y que se aproximan a este porcentaje también la anfotericina-B (93,5%) y la 5-fluorocitosina (94,7%).

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

En el presente control se analizaron 56 hojas de respuesta de participantes que efectuaban algún comentario, a veces varios, por lo que el número total fue de 78. Como siempre, algunos fueron muy extensos, lo que obligó a sintetizarlos por parte del Programa de Control de Calidad SEIMC, siempre tratando de no desvirtuar la idea que pretendían transmitir. [Nuevamente, se recomienda hacerlos de forma precisa y escueta].

En la tabla 8 se resumen los comentarios técnico-microbiológicos. Como era de esperar, la mayor parte de los comentarios microbiológicos van dirigidos a la sensibilidad/resistencia *in vitro* a los azoles y a la realización del antifungigrama. Unos informarían sólo el fluconazol, ya que éste era sensible y otros, que obtienen resistencia, informarían la anfotericina-B. En dos ocasiones los participantes lamentan la falta de criterios que indiquen en qué situaciones se tendría que hacer el estudio de sensibilidad, de qué manera y qué antifúngicos sería adecuado estudiar y, por lo tanto, plantean que se cree una normativa que sirva de guía para todos los laboratorios. No en vano, el comentario más frecuente es el que se refiere a la recomendación de que estas pruebas sean realizadas en laboratorios de referencia. En cuanto a la técnica del antifungigrama parece que hay consenso en que el adecuado es la

determinación de la CMI y no la sensibilidad disco-placa, haciendo referencia a las recomendaciones del NCCLS. Otros participantes informan de la realización de diferentes pruebas que les permiten diferenciar *C. albicans* de *C. dublinensis*, en especial el cultivo a 42°C, ya que la primera especie es termotolerante y mientras que la segunda no lo es. El resto de los comentarios se exponen en la tabla 8.

Tabla 8. Comentarios técnico-microbiológicos efectuados por los participantes.

Comentario	Número	% ^a
El antifungigrama (ATF) se realiza en el laboratorio de referencia	20	35,7
El ATF en disco-placa no está estandarizado	4	7,1
¿Se debe hacer ATF? ¿En qué situaciones? Conviene elaborar normativa	2	3,6
No procede la realización de antifungigrama	1	1,8
No hay puntos de corte para anfotericina-B, ketoconazol y voriconazol	1	1,8
El NCCLS recomienda ATF por microdilución en caldo o E-test®	1	1,8
El NCCLS interpreta CMI de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina	1	1,8
La lectura de los azoles se realiza a las 24 h de incubación	1	1,8
Cepa sensible a fluconazol y a todos los azoles	3	5,3
La resistencia al fluconazol en <i>C. albicans</i> es rara	1	1,8
Si hay resistencia inducida a fluconazol es cruzada para todos los azoles	1	1,8
No informaría 5-fluocitosina, miconazol y ketoconazol	1	1,8
No informaría anfotericina-B, 5-fluorocitosina y voriconazol	1	1,8
Si hay resistencia al fluconazol informaría la anfotericina-B	1	1,8
Sólo informaría el fluconazol	1	1,8
Se diferencia de <i>C. dublinensis</i> por ser termotolerante	6	10,7
Crece a 42°C y a 37°C	4	7,1
Colonia de color verde en la placa cromógena	2	3,6
A 25°C produce clamidosporas	2	3,6
Total comentarios técnico-microbiológicos	55	98,2

^aSobre las 56 respuestas con comentarios.

En esta ocasión, los comentarios clínico-terapéuticos (tabla 9) se agrupan prácticamente en una sola categoría, la del tratamiento antifúngico y antirretroviral del paciente. Así, tenemos el grupo de los que recomiendan tratar con fluconazol/itraconazol (cepa sensible) y el de los que recomiendan el uso de anfotericina-B (cepa resistente a los azoles). La historia clínica del paciente hacía sospechar una posible resistencia al fluconazol (y por extensión, una disminución de la sensibilidad a los otros azoles), razón por la cual algunos participantes no realizan pruebas de sensibilidad y recomiendan el cambio de tratamiento a otro antifúngico que no presente resistencia cruzada. Otros participantes comentan que un tratamiento antirretroviral correcto, con la consiguientes normalización de la cifra de CD4+ y el descenso de la carga vírica del VIH, hace innecesaria la pauta de profilaxis para algunas enfermedades oportunistas incluyendo la candidiasis aunque, por el contrario, uno recomendaría reanudar la profilaxis secundaria con fluconazol. El resto de los comentarios se exponen en la tabla 9.

Tabla 9. Comentarios clínicos y terapéuticos realizados por los participantes.

Comentario	Número	% ^a
Hay que sospechar la resistencia al fluconazol por la historia clínica	6	10,7
Las recaídas se debían a la cifra baja de CD4+	4	7,1
Con la cifra actual de CD4+ no hace falta profilaxis	3	5,3
El nivel RNA-VIH y los inhibidores de la proteasa relacionados con la colonización	2	3,6
El tratamiento antirretroviral correcto controla las infecciones oportunistas	2	3,6
No tratar con anfotericina-B por tener elevada la cifra de CD4+	2	3,6
Se recomienda reanudar el tratamiento con fluconazol	1	1,8
Se recomienda tratar con fluconazol o itraconazol	1	1,8
Se recomienda tratar con itraconazol o caspofungina	1	1,8
El tratamiento se debe hacerse con anfotericina-B	1	1,8
Total comentarios clínico-terapéuticos	23	41,1

^aSobre las 56 respuestas con comentarios.

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

Por lo que respecta a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación de la cepa o para el estudio de la sensibilidad obtenemos los siguiente datos: 163 (80,3%) laboratorios dicen no utilizarlo, 21 (10,3%) no lo informan y 19 (9,3%) afirman haberlo utilizarlo parcialmente.