

CONTROL DE CALIDAD DE MICOLOGÍA (M-2/00)

En este control se remitió a los participantes un cultivo de una cepa identificada por el laboratorio que actuó de referencia como *Candida glabrata* resistente a los derivados azólicos. Había sido aislada de los hemocultivos de un paciente de 32 años, seropositivo para el VIH, que acudió a la consulta de Enfermedades Infecciosas por presentar un dolor dorso-lumbar, de comienzo brusco, acompañado de fiebre continua de 38 °C. Al ingreso, se observaron lesiones pustulosas en el cuero cabelludo y *muguet* bucal, y se procedió a su hospitalización. El paciente era consumidor habitual de heroína. Desde hacía seis meses estaba recibiendo tratamiento profiláctico con fluconazol por haber presentado una candidiasis esofágica. Estaba siendo tratado con antivíricos (AZT, DDI e indinavir), pero reconoció que tomaba los fármacos de forma anárquica y discontinua. En el momento del ingreso, la carga vírica plasmática era de 4,8 log/ml y presentaba una leucocitosis y velocidad de sedimentación de 89 mm/1ª hora. En la radiografía simple de la columna vertebral se observó una disminución del espacio intervertebral entre L1 y L2. La resonancia magnética reveló una disminución de señal y altura de ambos cuerpos vertebrales, así como del disco intervertebral. Se tomaron tres muestras de sangre para cultivo y del material obtenido por punción vertebral, se aisló el hongo objeto de este control. Se solicitó a los participantes la identificación y el estudio de sensibilidad a los antifúngicos del hongo implicado en este cuadro clínico, así como formular los comentarios que se considerasen oportunos.

El objetivo prioritario de este control fue conocer la capacidad de los laboratorios para identificar una especie de levadura distinta de *Candida albicans* y poner a prueba los diversos sistemas comerciales de identificación, cada vez más frecuentes en los laboratorios de Microbiología, comparándolos con los métodos convencionales. También se consideró como un objetivo importante conocer la disponibilidad de los participantes para llevar a cabo estudios de sensibilidad a los antifúngicos y, tratándose de una cepa de *C. glabrata* resistente a los azoles, sondear la capacidad de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los derivados azólicos. Este control se envió a 190 laboratorios.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se recibió respuesta de 172 centros, lo que supone un porcentaje de participación real del 90,5%. Todos, excepto dos, llegaron a algún tipo de identificación. En el análisis se ha prescindido también de una identificación de género *Fusarium*, habida cuenta que el participante alegó, con posterioridad, haber confundido la muestra M-2/00 con la que se le remitió en el anterior control M-1/00. De los 169 restantes, en 155 (91,7%) la identificación es coincidente con el laboratorio de referencia para este control; en 23 centros (13,5%) la denominan *Torulopsis glabrata* y en 132 (77,6%) *Candida glabrata*. Los 15 restantes la identifican de forma diversa y, en algunos casos, sorprendente, como la identificación de género *Trichosporon* o *Prototheca* (tabla 1).

Tabla 1. Resultados de identificación de los participantes.

Identificación	Número	%
<i>Candida glabrata</i>	132	78,1
<i>Torulopsis glabrata</i>	23	13,6
Género <i>Candida</i>	8	4,7
<i>Candida albicans</i>	1	0,6
<i>Candida krusei</i>	1	0,6
<i>Candida tropicalis</i>	1	0,6
Género <i>Trichosporon</i>	1	0,6
<i>Prototheca wickerhamii</i>	1	0,6
Género <i>Prototheca</i>	1	0,6
Total	169	100,0

Hay ocho laboratorios (4,7%) que no indican las pruebas de identificación que realizaron. La mayoría de los participantes utilizaron métodos bioquímicos para la identificación de la cepa enviada, en 18 casos complementados con la prueba de la filamentación. Los métodos más usados se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos usados para la identificación.

Método	Número	%
Pruebas bioquímicas	132	78,1
Pruebas bioquímicas+filamentación	14	8,3
Morfología+pruebas bioquímicas	4	2,4
Pruebas bioquímicas+microscopía	3	1,8
Filamentación	3	1,8
Cultivo	2	1,2
Microscopía	1	1,2
Cultivo+Filamentación	1	0,6
Filamentación+Microcultivo	1	0,6
No informa	8	4,7
Total	169	100,0

Los métodos más utilizados fueron los de procedencia comercial (tabla 3). Pocos centros utilizaron la prueba de la filamentación precoz o las pruebas bioquímicas no comerciales.

Tabla 3. Marcas comerciales usadas para la identificación.

Método	Número	%
API 20C AUX (bioMérieux)	37	23,4
API ID 32C (bioMérieux)	31	19,6
Vitek (bioMérieux)	16	10,1
Auxacolor (Pasteur)	16	10,1
Microscan (Dade)	12	7,6
API (bioMérieux) ^a	9	5,7
Auxonograma	8	5,1
Chromagar (BBL)	6	3,8
Candifast (Oxoid)	3	1,9
Vitek + API 20 C AUX	3	1,9
Vitek + API ID 32	3	1,9
Vitek + API ID 32	3	1,9
Chromagar + API 20 C	3	1,9
Mycotube	2	1,3
Rapid ID (Izasa)	1	0,6
Chromagar + API ID 32	1	0,6
Chromagar + Vitek	1	0,6
Chromagar + Auxacolor	1	0,6
Fungichrom	1	0,6
Fungiscreen + Rapid ID (Izasa)	1	0,6
Total	158	100,0

^aNo especifican si se trata del API 20C AUX o ID 32C

Todos los laboratorios que usaron el sistema ID 32C identificaron la levadura correctamente como *C. glabrata*. De los centros que usaron el sistema API 20C AUX, sólo uno la identificó de forma incorrecta como *P. wickerhamii*. El laboratorio que identificó la cepa enviada como género *Prothoteca* utilizó el sistema comercializado por Microscan, y también el que la identificó como *Candida tropicalis*. De entre los centros que identificaron únicamente como género *Candida*, cinco utilizaron métodos manuales, y uno Vitek. La identificación de *Candida albicans* fue obtenida mediante Vitek. Por lo tanto, no parece que las discrepancias sean atribuibles a errores de un sistema comercial en particular, a diferencia de un anterior control [M-2/98 (*Candida krusei*)], en donde sí se observaron tendencias.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Los resultados de la sensibilidad a los antifúngicos, obtenidos por el laboratorio que actuó como centro de referencia, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Sensibilidad antifúngica según el centro de referencia.

Antifúngico	CMI (µg/ml)	Interpretación ^a
Anfotericina B ^b	0,03	S
5-Fluorocitosina	≤0,03	S
Fluconazol	256	R
Itraconazol	≥16	R

^aS: sensible; R: Resistente

^bAtención: ver texto

El laboratorio de referencia hizo hincapié en que el documento NCCLS M27-A aporta puntos de corte para el fluconazol, itraconazol y fluocitosina, reflejados en la tabla 5. No existen puntos de corte definidos para la anfotericina B, miconazol, ketoconazol, clotrimazol ni nistatina. Asimismo, dicho laboratorio no refiere la sensibilidad al ketoconazol ni al miconazol, pues carecen de justificación clínica en el caso que nos ocupa. La interpretación se ha hecho siguiendo los criterios del NCCLS, Documento M-27A, excepto para la anfotericina B, basada en artículos y en la experiencia.

Tabla 5. Interpretación de la sensibilidad a los antifúngicos según el documento NCCLS M27-A

Antifúngico	Sensible	SDD ^a	Intermedio	Resistente
Fluconazol	≤8	16-32	–	≥ 64
Itraconazol	≤0,0125	0,25-0,5	–	≥1
Fluocitosina	≤4	–	8 - 16	≥ 32

^aSDD: Sensible Dependiente de la Dosis

De los 169 laboratorios que enviaron respuesta analizable, 78 (45,9%) no realizaron estudio de sensibilidad. Los restantes 92 participantes (54,1%), utilizan el método disco-placa en 13 centros y el estudio de las CMI en 79, lo que supone un 85,9 % sobre el total de los que estudian la sensibilidad antifúngica. Sólo 76 centros informan de la marca comercial usada. La tabla 6 resume la distribución de marcas comerciales del antifungigrama.

Tabla 6. Marcas comerciales usadas en el fungigrama.

Marca	Número	%
Sensititre (Izasa)	30	39,5
Fungitest (Pasteur)	26	34,2
ATB-Fungus (bioMérieux)	9	11,8
E-Test (AB-Biodisk)	8	10,5
Candifast	3	3,9
Total	76	100,0

La tabla 7 resume los resultados cualitativos de la sensibilidad a los antifúngicos, con independencia del método utilizado (disco-placa o interpretación de las CMI). Se contabilizan en la tabla todos los resultados de sensibilidad aportados por los laboratorios participantes, no representando la lista de compuestos que en ella aparecen recomendación técnica alguna por parte del Programa de Control de Calidad ni del laboratorio que actuó como centro de referencia.

Tabla 7. Resultados cualitativos de la sensibilidad a los antifúngicos.

Antifúngico	Informan (número)	Número (% sobre respuestas)					
		Sensible		Intermedio		Resistente	
Anfotericina B	89	87	(97,8)	1	(1,1)	1	(1,1)
5-fluorocitosina	86	80	(93,0)	1	(1,2)	5	(5,8)
Fluconazol	79 ^a	3	(3,8)	10	(12,6)	63	(79,7)
Ketoconazol	71	10	(14,1)	22	(31,0)	39	(54,9)
Itraconazol	64 ^a	1	(1,6)	8	(12,5)	52	(81,3)
Miconazol	37	11	(29,7)	16	(43,2)	10	(27,0)
Econazol	16	9	(56,2)	2	(12,5)	5	(31,3)
Clotrimazol	7	1	(14,3)	-	-	6	(85,7)
Nistatina	19	18	(94,7)	-	-	1	(5,3)

^aTres centros informan como SDD (Sensible Dependiente de la Dosis)

Resulta significativo que el 12,6% de los participantes consideren a la cepa "Intermedia" al fluconazol (categoría no definida por el NCCLS para este antifúngico) y que el 3,8% la catalogue como "Sensible", cuando la CMI aportada por el centro de referencia tiene un valor muy elevado (256 µg/ml). También llama la atención que un 5,8% de los participantes informe "Resistencia" a la 5-fluorocitosina, cuando los valores para definir esta categoría son elevados (≥ 32 µg/ml) y la CMI del centro de referencia fue 0,03 µg/ml. Hay que hacer constar también que la nomenclatura "Intermedio", aunque utilizada por algunos centros, no está avalada por el Documento M-27A del NCCLS para el fluconazol e itraconazol, siendo reconocida, en su lugar, la categoría de SDD (Sensible Dependiente de la Dosis). Sólo tres centros consideran a la cepa como SDD para el fluconazol y otros tres para el itraconazol.

Existe una gran variabilidad cuando analizamos los resultados de la sensibilidad para cada antifúngico en particular, que se hace más patente si correlacionamos la CMI obtenida con la categoría cualitativa (Sensible, Resistente, etc.) a la que adscriben el resultado, tal como se aprecia en las Tablas 8 a 12.

Anfotericina B

Los resultados de sensibilidad cuantitativa para la anfotericina y su interpretación se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 8. CMI informadas para la anfotericina B.

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	I	R
$\leq 0,002$	1	1	-	-
0,008	1	1	-	-
0,016	1	1	-	-
0,03	5	5	-	-
0,047	2	2	-	-
0,06	2	2	-	-
>0,125	9	9	-	-
0,25	7	7	-	-
0,5	8	8	-	-
0,75	1	1	-	-
≤ 1	5	5	-	-
≤ 2	10	10	-	-

2-8	1	1	-	-
-----	---	---	---	---

El valor modal para los participantes fue de 2 µg/ml y el informado por el centro de referencia de 0,03 µg/ml, siendo el aislamiento considerado como "Sensible". Sólo algunos centros hacen referencia en el apartado de comentarios que no existen puntos de corte definidos para la anfotericina B. No se incluye en esta tabla un centro que informa "Intermedio" (método ATB-Fungus®), ni el que informa "Resistente" (Candifast®), puesto que no refieren sus resultados de CMI. Un centro no interpreta la CMI obtenida por E-test® (6-8µg/ml), aunque se aleja bastante de los aportados por el centro de referencia.

5-fluorocitosina

Tabla 9. CMI informadas para la 5-fluorocitosina.

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	I	R
≤0,002	1	1	-	-
0,012	1	1	-	-
0,016	1	1	-	-
≤0,03	20	20	-	-
≤0,06	7	7	-	-
0,125	3	3	-	-
≤0,25	3	3	-	-
1	1	1	-	-
≤2	10	10	-	-
2-32	1	1	-	-
≤4	1	1	-	-

El valor modal fue ≤0,03 µg/ml, coincidiendo con el obtenido por el centro de referencia. Este valor es considerado como "Sensible". Los cinco centros que consideran a la cepa enviada como "Resistente" no informan de la CMI obtenida (no constan en la tabla); tres utilizan disco-placa, uno el método E-test® y el otro Candifast®. Un centro que informa como "Intermedio" no aporta el valor de la CMI, y otro con una CMI ≤0,03 µg/ml no interpreta dicho valor.

Fluconazol

La sensibilidad a este compuesto constituía uno de los objetivos más importantes del presente control. El valor modal fue de >256 µg/ml, coincidiendo con el informado por el laboratorio de referencia, siendo catalogado como "Resistente". Los tres centros que informan como "Sensible" no informan del valor de la CMI obtenida.

Tabla 10. CMI informadas para el fluconazol.

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		SD ^a	I ^b	R
1-8	1	-	1	-
8-64	2	1	1	-
32	2	1	-	1
>64	10	-	1	9
128	6	-	-	6
>256	29	-	-	29

^aCorrespondería a la SDD del documento NCCLS 27-A.

^bNo existe esta categoría en el documento NCCLS 27-A, sino SDD.

Itraconazol

El valor modal es ≥16 µg/ml, coincidiendo con el valor informado por el centro de referencia. Ante una infección sistémica, este antifúngico no debiera ser informado en el antifungigrama de *C. glabrata*.

Tabla 11. CMI informadas para el itraconazol.

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	I ^a	R
0,5	3	2	1	-
>0,5-4	1	-	1	-
1	1	-	-	1
>4	8	-	1	7
8	1	-	-	1
16	4	-	-	4

>16	22	-	-	22
>32	5	-	-	5

^aNo existe dicha categoría en el documento NCCLS 27-A, sino SDD.

Ketoconazol

El laboratorio de referencia no informó la sensibilidad a este antifúngico debido a que, aunque es posible realizarla mediante algunos equipos comerciales, no tiene justificación clínica en este caso.

Tabla 12. CMI informadas para el ketoconazol.

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	I	R
0,19	1	1	-	-
>0,5-<4	1	-	1	-
1	4	1	3	-
1-8	1	-	1	-
2	2	-	1	1
4	4	-	3	1
>4	8	-	1	7
8	2	-	-	2
16	2	-	-	2
>16	3	-	-	3
>32	1	-	-	1

UTILIZACIÓN DE LABORATORIOS EXTERNOS DE REFERENCIA Y COMENTARIOS

De los 170 centros que envían hoja de respuesta con datos, sólo uno indica que remite el control a un laboratorio externo de referencia; lo informan correctamente como *C. glabrata* y, además, los resultados aportados coinciden con los del control. En 21 centros no informan si lo han usado o no, y seis participantes utilizan el centro externo de forma parcial, probablemente para las pruebas de sensibilidad, identificando correctamente la cepa.

Por lo que se refiere a los comentarios, 24 centros hacen mención explícita a la resistencia de *C. glabrata* a los azoles. Únicamente 13 laboratorios señalan que, en este caso, el antifúngico de elección para el tratamiento sería la anfotericina B, sola o asociada a la 5-fluorocitosina. En tres ocasiones señalan que no están definidos los criterios para interpretar las CMI de *C. glabrata*, y en 12 que la profilaxis con fluconazol selecciona cepas resistentes.

A modo de resumen, hay que volver a señalar la amplia variabilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad para todos los antifúngicos, así como la dispersión en los criterios de interpretación. Se puede concluir que es muy difícil la valoración de los métodos comerciales existentes en la actualidad, pero que es ineludible someterlos al buen juicio del profesional microbiólogo. En cuanto a la valoración de los sistemas de identificación comerciales, aún siendo los resultados aceptables en términos generales, no por ello hay que dejar de señalar el porcentaje notable de identificaciones discordantes. Esta situación no se hubiera producido de haber complementado el método comercial con algunas pruebas convencionales sencillas (morfología, prueba de filamentación precoz, etc.).

Se deduce de este control que los microbiólogos usan en su mayoría métodos comerciales para identificar levaduras que no son *C. albicans* y, comparándolo con un control anterior en el que la cepa enviada fue *C. krusei*, es posible observar un aumento del número de centros que realizan el antifungigrama y una mejoría en cuanto al nivel de interpretación correcta.