

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOLOGÍA (M-2/01)

En este control se remitió a los participantes un cultivo de una cepa identificada por el laboratorio que actuó de referencia como *Candida lusitanae*. Dicha cepa se aisló a partir de los hemocultivos y aspirado vítreo de un paciente de 24 años, adicto a la heroína por vía parenteral, que acudió a urgencias por presentar una disminución de la agudeza visual en el ojo izquierdo. Como antecedentes inmediatos de interés, el paciente relataba no haber tenido sensación febril ni dolor ocular en los días previos, aunque sí había percibido en los últimos meses una sensación de “bultos” en el cuero cabelludo que desaparecían espontáneamente.

En la exploración oftálmica se observaba una hiperemia y quemosis conjuntival, así como signos de vitritis. No se encontraron otros hallazgos significativos en la exploración física, no apreciándose en ese momento pústulas o signos de foliculitis en el cuero cabelludo. Finalmente, se ingresó al paciente y se tomó una muestra de sangre, que fue enviada al laboratorio de Microbiología para cultivo. Se le practicó una vitrectomía y, tanto en el hemocultivo como en el aspirado vítreo, se aisló el hongo levaduriforme remitido en este control. Se solicitó a los participantes la **identificación** de dicho hongo, así como formular los **comentarios** que se considerasen oportunos.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN

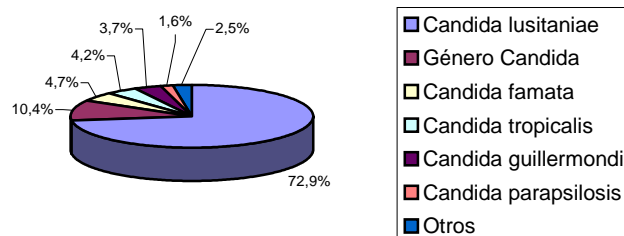
De los 197 laboratorios a los que se envió el control, 192 remitieron hoja de respuesta, lo que supone un porcentaje de participación real del 97,5%. Todos, excepto un centro (0,5%), quien tan sólo aporta el dato de que se trata de una levadura, llegaron a algún tipo de identificación definitiva. De los 192 participantes que responden, 140 (72,9%) aportan un resultado coincidente con el emitido por el laboratorio de referencia y 20 centros (10,4%), aunque no detallan la especie, sí llegan a una correcta identificación genérica de la levadura objeto del control. Por otra parte, un total de 28 centros (14,6%) informan otras especies pertenecientes al género *Candida*, y tres laboratorios (1,6%) identifican la cepa a estudiar como perteneciente al género *Cryptococcus*, detallándose en dos de ellos la especie. Todos estos datos quedan reflejados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Resultados de identificación de los participantes.**

Identificación	Número	%
<i>Candida lusitanae</i>	140	72,9
Género <i>Candida</i>	20	10,4
<i>Candida famata</i>	9	4,7
<i>Candida tropicalis</i>	8	4,2
<i>Candida guilliermondii</i>	7	3,7
<i>Candida parapsilosis</i>	3	1,6
<i>Candida albicans</i>	1	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0,5
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0,5
Género <i>Cryptococcus</i>	1	0,5
Levadura	1	0,5
Total	192	100,0

Así pues, un porcentaje muy importante de los participantes (72,9%) emitieron una respuesta que coincidía con el resultado de referencia (*C. lusitanae*), tal y como queda reflejado en la Figura 1. También cabe destacar que un número considerable de centros informaron especies incluidas dentro del género *Candida* (*C. famata*, *C. tropicalis*, *C. Guilliermondii*, etc.).

**Figura 1. Distribución de los resultados de identificación**



En cuanto a los métodos empleados para la identificación, cabe destacar que, de los 192 laboratorios que enviaron hoja de respuesta, son 10 (5,2%) los centros que no informan del método empleado. El resto, aunque aporta en conjunto una amplia variabilidad de técnicas, la gran mayoría, como puede observarse en la tabla 2, utiliza pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa enviada, complementadas en algunos casos con la prueba de la filamentación y las características morfológicas y de cultivo del hongo problema.

**Tabla 2. Métodos usados para la identificación.**

Método	Número	%
Pruebas bioquímicas	149	77,6
Pruebas bioquímicas + filamentación	10	5,2
Pruebas bioquímicas + cultivo	9	4,7
Pruebas bioquímicas + morfología	4	2,1
Filamentación	3	1,6
Cultivo	2	1,1
Cultivo + microscopía	1	0,5
Filamentación + cultivo	1	0,5
Filamentación + hidrólisis de la Urea	1	0,5
Filamentación + microscopía	1	0,5
Microscopía + sensibilidad a la cicloheximida	1	0,5
No informa	10	5,2
Total	192	100,0

Los métodos más utilizados fueron las pruebas bioquímicas de procedencia comercial (tabla 3). En 182 ocasiones se hace referencia a algún tipo concreto de prueba bioquímica incluida en algún equipo comercial, o junto a métodos manuales (filamentación, características morfológicas, cultivo, etc.). Hay nueve laboratorios que emplean dos equipos comerciales para la identificación.

**Tabla 3. Marcas comerciales usadas para la identificación.**

Método	Número	%
API 20C AUX (bioMérieux)	66	36,3
API ID 32C (bioMérieux)	37	20,4
Vitek YBC (bioMérieux)	18	9,9
Auxacolor (BioRad)	16	8,8
Vitek-2 (bioMérieux)	14	7,7
Microscan (Dade-Behring)	13	7,1
API (sin especificar)	5	2,8
Candifast (Oxoid)	3	1,6
Rapid Yeast Plus System (Izasa)	3	1,6
Otros	3	1,6
Manual	2	1,1
No informa marca	2	1,1
Total	182	100,0

Como se puede observar en la tabla 3, destacan los equipos comerciales de la marca bioMérieux, sobre todo sus galerías de pruebas bioquímicas, pero también tienen aceptación los equipos automáticos (Vitek YBC y Vitek-2). De los 103 laboratorios que usaron los sistemas API, fueron 81 (78,6%) los que identificaron la levadura correctamente como *C. lusitanae*. Todos los laboratorios que emplean el Vitek-2 llegaron a una correcta identificación de género y especie. Los que usaron el Vitek YBC tienen una proporción de aciertos de 15 sobre 17. De los 16 que utilizaron el sistema Auxacolor (BioRad) fueron 15 los participantes que alcanzaron una correcta identificación de especie.

Hubo tres laboratorios que identificaron la cepa como género *Cryptococcus*; uno de ellos emplea un sistema API, sin especificar tipo, y los otros dos usan galerías comerciales de bioMérieux. Así, en definitiva, podemos concluir que las discrepancias no son atribuibles a un sistema comercial en particular, sino que quedan distribuidas de modo uniforme, al igual que ocurría en un control anterior [M-2/00 (*Candida glabrata*)]

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

De los 192 laboratorios que enviaron respuesta, el estudio de sensibilidad fue realizado por 110 centros (57,3%). Como puede observarse en la tabla 4, los métodos mayoritariamente empleados fueron los basados en la determinación de la CMI, usado por 44 laboratorios (40,0%) y en el estudio de las concentraciones críticas, utilizado por 34 centros (33,6%). De estos 37 participantes, 22 laboratorios emplearon una técnica que, aunque basada en el hallazgo de concentraciones críticas, usa para ello placas de microdilución. Hay tres centros que determinaron la CMI, pero sin establecer si se trataba de un E-test® o una microdilución. El método de disco-placa tan sólo fue empleado por 11 laboratorios (10,0%).

**Tabla 4. Métodos empleados en el antifungigrama.**

Método	Número	%
CMI- microdilución	44	40,0
Concentraciones críticas	37	33,6
Disco-placa	11	10,0
No Informa	8	7,3
CMI- E-test®	7	6,4
CMI	3	2,7
Total	110	100,0

En cuanto a los equipos comerciales, destaca mayoritariamente la marca Sensititre (Izasa), que se basa en la determinación de la CMI en microplacas. Un considerable número de centros empleó el equipo Fungitest (BioRad), que hace una determinación de concentraciones críticas por microdilución. De los 11 participantes que no informaron de la marca comercial, ocho tampoco refirieron el método empleado, seis dicen hacer una determinación de CMI por E-Test, dos emplean el método de disco-placa y uno estudia la CMI por microtitulación. Finalmente destacar los 12 participantes que utilizan el equipo comercial ATB-Fungus (bioMérieux), cuya técnica se basa en una determinación de concentraciones críticas. Todos estos datos los podemos ver resumidos en la tabla 5.

**Tabla 5. Marcas comerciales usadas en el fungigrama.**

Marca	Número	%
Sensititre (Izasa)	43	39,1
Fungitest (BioRad)	22	20,0
ATB-Fungus (bioMérieux)	12	10,9
No informa marca	11	10,0
E-test® (AB-Biodisk)	7	6,4
Rosco (Izasa)	6	5,5
Candifast (Oxoid)	3	2,7
BioRad	2	1,8
bioMérieux	1	0,9
Izasa, sin especificar	1	0,9
Microscan	1	0,9
Remel	1	0,9
Total	110	100,0

Los resultados de la sensibilidad a los antifúngicos, obtenidos por el laboratorio que actuó como centro de referencia se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Sensibilidad antifúngica según el centro de referencia.**

Antifúngico	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interpretación <sup>a</sup>
Anfotericina B <sup>b</sup>	0,25	S
5-Fluorocitosina	0,06	S
Fluconazol	2	S
Itraconazol	0,25	SDD
Ketoconazol	0,03	S

<sup>a</sup>S: sensible; SDD: Sensible Dosis-Dependiente.

<sup>b</sup>Atención: ver texto

Es importante recordar que el documento NCCLS M27-A aporta puntos de corte para el fluconazol, itraconazol y fluocitosina, reflejados en la tabla 7. No existen puntos de corte definidos para la anfotericina B, miconazol, ketoconazol, clotrimazol ni nistatina. La interpretación aportada por el laboratorio que actuó como centro de referencia se ha hecho siguiendo los criterios del NCCLS, Documento M-27A, excepto para la anfotericina B y el ketoconazol, basada en artículos y en la experiencia.

**Tabla 7. Interpretación de la sensibilidad a los antifúngicos según el documento NCCLS M27-A**

Antifúngico	Sensible	SDD <sup>a</sup>	Intermedio	Resistente
Fluconazol	$\leq 8$	16-32	–	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,0125$	0,25-0,5	–	$\geq 1$
5-Fluocitosina	$\leq 4$	–	8 - 16	$\geq 32$

<sup>a</sup>SDD: Sensible Dependiente de la Dosis

En la tabla 8 se resumen los resultados cualitativos de la sensibilidad a los antifúngicos, independientemente del método utilizado. En dicha tabla se contabilizan todos los resultados de sensibilidad aportados por los laboratorios participantes, pero la lista de compuestos que en ella aparece no refleja recomendación técnica alguna por parte del Programa de Control de Calidad ni del laboratorio que actuó como centro de referencia. Además de los antifúngicos que se muestran en la tabla, hay un laboratorio que estudia la sensibilidad a la griseofulvina interpretándola como resistente, con una CMI de  $1\mu\text{g/ml}$ , otro el ketoconazol, al que la cepa es sensible con una CMI de  $1\mu\text{g/ml}$ , y finalmente un tercero interpreta de forma genérica los azoles como resistentes.

Resulta significativo que el 5,0% de los participantes que estudian la sensibilidad al itraconazol consideren a la cepa "Intermedia" a este antifúngico siendo ésta una categoría no definida por el NCCLS para ese compuesto. También llama la atención que un 4,0% de los participantes informen "Resistencia" a la 5-fluorocitosina, cuando los valores para definir esta categoría son elevados ( $\geq 32\mu\text{g/ml}$ ) y la CMI del centro de referencia fue  $0,06\mu\text{g/ml}$ . Lo mismo ocurre con el fluconazol para el que se informa "Resistencia" en un 4,3% de los casos, cuando los valores según el NCCLS para definirla son igualmente muy altos ( $\geq 64\mu\text{g/ml}$ ) y la CMI obtenida por el centro de referencia fue de  $2\mu\text{g/ml}$ . Es

importante recordar que la nomenclatura “Intermedio” (empleada por algunos participantes) no es reconocida por el NCCLS (Documento M-27A) para el fluconazol e itraconazol, siendo aceptado sin embargo el término SDD (Sensible dependiente de la dosis).

Por otra parte, se observa una gran variabilidad en la interpretación de los resultados de sensibilidad para cada antifúngico, sobre todo si intentamos correlacionar la CMI obtenida con el resultado cualitativo. Todos estos datos, los podemos apreciar detallados en las tablas 9 a la 13, en las que se hace un análisis individualizado de los principales antifúngicos estudiados.

**Tabla 8. Resultados cualitativos de la sensibilidad a los antifúngicos.**

Antifúngico	Informan (número)	Sensible		Resistente		Intermedio		No Interpreta	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Anfotericina B	104	88	84,6	7	6,7	-	-	9	8,7
5-fluorocitosina	100	91	91,0	4	4,0	-	-	5	5,0
Fluconazol	93	84	90,3	4	4,3	1	1,1	4	4,3
Ketoconazol	84	76 <sup>a</sup>	90,5	2	2,4	-	-	6	7,1
Itraconazol	80	69 <sup>b</sup>	86,3	2	2,5	4	5,0	5	6,2
Miconazol	35	28	80,0	4	11,4	2	5,7	1	2,9
Nistatina	19	16	84,2	3	15,8	-	-	-	-
Econazol	16	12	75,0	3	18,8	1	6,2	-	-
Tioconazol	2	2	100,0	-	-	-	-	-	-
Voriconazol	2	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0

<sup>a</sup>Un centro informa como SDD (Sensible Dependiente de la Dosis).

<sup>b</sup>Diez centros informan como SDD.

### Anfotericina B

De los 104 laboratorios que estudian la sensibilidad a la anfotericina B, sólo 70 aporta un resultado cuantitativo, que son los que ahora se analizan. El valor modal para los participantes fue de 0,125 µg/ml y el informado por el centro de referencia de 0,25 µg/ml, siendo el resultado interpretado como “Sensible”. Tan sólo tres de los nueve centros que no hacen una interpretación de la CMI comentan que no existen puntos de corte definidos para este antifúngico por el NCCLS. De los siete que consideran la cepa resistente, seis no dan un dato cuantitativo: tres emplean disco-placa, dos el método de las concentraciones críticas y uno la microdilución (tabla 9).

**Tabla 9. CMI informadas para la Anfotericina B.**

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	R	No interp.
≤0,05	9	7	-	2
0,06	10	9	-	1
0,12	17	16	-	1
≤0,25	13	11	-	2
0,5	2	2	-	-
≤1	7	5	-	2
≤2	9	9	-	-
4	1	1	-	-
>8	1	-	1	-
>32	1	-	1	-

### 5-fluorocitosina

De los 100 laboratorios participantes que prueban la 5-fluorocitosina, sólo 67 informan de los resultados cuantitativos obtenidos. Éstos y su interpretación cualitativa se reflejan en la tabla 10.

**Tabla 10. CMI informadas para la 5-fluorocitosina.**

CMI (µg/ml)	Total	Número que informa		
		S	No inter	R
≤0,03	24	22	2	-
≤0,08	10	10	-	-
0,125	5	5	-	-
≤0,25	1	-	1	-
0,25	3	3	-	-
≤0,5	1	1	-	-
0,5	2	1	1	-
≤2	8	8	-	-
2	1	1	-	-
>32	2	1	1	-

Los valores que más se repitieron fueron  $\leq 0,03$   $\mu\text{g/ml}$  y  $0,06$   $\mu\text{g/ml}$ , (encuadrado dentro de la categoría  $\leq 0,08$   $\mu\text{g/ml}$ ) coincidiendo este último con el obtenido por el centro de referencia. Este valor es considerado como "Sensible". Los cuatro centros que consideran a la cepa enviada como "Resistente" no informan de la CMI obtenida (no constan en la tabla); tres utilizan disco-placa y uno un método de concentraciones críticas (ATB Fungus).

### Fluconazol

Fueron 66 centros de los 93 que estudiaron la sensibilidad de la cepa al fluconazol, los que aportaron un resultado cuantitativo, tal como se resume en la tabla 11.

**Tabla 11. CMI informadas para el fluconazol.**

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total	Número que informa		
		S	No inter	R
0,125	4	4	-	-
0,25	4	3	1	-
0,38	1	-	1	-
0,5	10	10	-	-
1	18	18	-	-
$\leq 2$	1	1	-	-
2	7	7	-	-
4	9	8	1	-
4-8	1	1	-	-
$\leq 8$	8	8	-	-
8	1	1	-	-
16	1	1	-	-
$>256$	1	-	1	-

El valor modal es  $1\mu\text{g/ml}$ , cercano por tanto al valor informado por el centro de referencia ( $2\mu\text{g/ml}$ ) que es interpretado como "Sensible", siguiendo los criterios del NCCLS. Llama la atención que en ningún momento se emplea el término SDD como cabría esperar del laboratorio que obtiene una CMI de  $16\mu\text{g/ml}$ . Por otro lado, un participante (no incluido en la tabla) describe una sensibilidad "intermedia" de la cepa al fluconazol, término no aceptado por el NCCLS para el fluconazol. Finalmente hay que resaltar que de los cuatro laboratorios que informan de "resistencia" al fluconazol, ninguno aporta datos cuantitativos.

### Ketoconazol

De los 84 centros que estudian la sensibilidad al ketoconazol, son 57 los laboratorios que aportan resultados cuantitativos, cuya relación puede observarse en la tabla 12. El valor modal es  $0,03\mu\text{g/ml}$ , coincidiendo con el valor informado por el centro de referencia.

**Tabla 12. CMI informadas para el ketoconazol.**

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total	Número que informa		
		S	No inter	R
$\leq 0,008$	13	12	1	-
$\leq 0,01$	3	1	2	-
0,016	10	10	-	-
$\leq 0,03$	1	1	-	-
0,03	11	11	-	-
0,06	3	3	-	-
0,08	1	1	-	-
0,125	1	1	-	-
0,16	1	-	1	-
$\leq 0,5$	7	6	1	-
0,5	2	2 <sup>a</sup>	-	-
1-1,5	1	-	1	-
1-8	1	1	-	-
12	1	1	-	-

<sup>a</sup> Uno de los laboratorios informa este valor como SDD.

### Itraconazol

De los 80 laboratorios que probaron la sensibilidad de la cepa estudiada al itraconazol, son 59 los centros que aportaron datos cuantitativos en cuanto a las CMIs obtenidas (ver tabla 13).

**Tabla 13. CMI informadas para el Itraconazol.**

CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total	Número que informa		
		S	No inter	SDD
$\leq 0,008$	3	2	2	-
0,015	1	1	-	-
0,023	2	1	1	-
0,03	2	2	-	-
0,032	1	1	-	-
0,06	9	8	1	-
0,125	13	13	-	-
0,125-0,25	1	-	-	1
0,25	10	4	-	6
0,25-0,5	1	-	-	1
$\leq 0,5$	6	4	1	1
0,5	4	3	-	1
0,75-1	1	-	1	-
$\leq 8$	1	1	-	-

El valor modal fue de 0,125  $\mu\text{g/ml}$  y se interpretó como sensible por los laboratorios que obtuvieron dicho resultado (de acuerdo con las normas del NCCLS) aunque el centro de referencia obtiene un valor de 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , que se interpreta como SDD. Seis de los diez participantes que informan el mismo valor que el centro de referencia, lo interpretan adecuadamente como SDD. Finalmente comentar que llama la atención el laboratorio que obtiene una CMI  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$  y que la informa como sensible y los cuatro que informan de CMI  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  y 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , que la informan como sensible, pudiendo ser SDD o sensible en el primer caso y sólo SDD en el segundo.

#### UTILIZACIÓN DE LABORATORIOS EXTERNOS DE REFERENCIA Y COMENTARIOS

De los 192 laboratorios que envían hoja de respuesta, son dos (1,0%) los centros que indican explícitamente que utilizaron un laboratorio externo de referencia, identificando la cepa correctamente como *C. lusitaniae* y realizando además antifungigrama. En 18 centros (9,4%) no informan si lo han usado o no, y seis participantes (3,1%) utilizan el centro externo de forma parcial, en cinco de ellos para las pruebas de sensibilidad, con una identificación correcta de la cepa en los seis. Los restantes 166 participantes (86,5%) contestaron que no requirieron un laboratorio externo.

Por lo que se refiere a los comentarios, 37 centros hacen mención explícita a la posibilidad de que *C. lusitaniae* desarrolle, en un porcentaje considerable de casos, resistencia a la anfotericina B; incluso alguno llega a comentar que ésta es una especie de *Candida* que puede ser sensible *in vitro* a la anfotericina, pero que *in vivo* tiene tendencia a desarrollar resistencias. Únicamente 19 laboratorios señalan que, en este caso, el tratamiento de elección serían en términos generales los azoles, concretamente el fluconazol, al que se podría añadir 5-fluorocitosina e incluso, según apuntan cuatro participantes, también anfotericina B en los pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, hay dos centros que siguen afirmando que el antifúngico de elección sería la anfotericina B. Por otro lado, en cuatro ocasiones los participantes exponen en sus comentarios que el NCCLS no tiene puntos de corte establecidos para la anfotericina B.

Para finalizar, hay que 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. En cuanto a los sistemas de identificación comerciales, en términos generales se puede decir que los resultados son aceptables, pero sigue existiendo un porcentaje considerable de identificaciones discordantes o que no llegan a una identificación completa de género y especie. Es por ello imprescindible recordar la importancia que siguen teniendo la valoración de las pruebas convencionales (características morfológicas, filamentación, etc.) a la hora de complementar los equipos comerciales de los que disponemos para llegar a una correcta identificación de la cepa en estudio.