

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOLOGÍA (M-2/12)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única levadura que fue identificada por el laboratorio de referencia como *Candida krusei*. Se acompañaba de una historia clínica que correspondía a un paciente varón de 65 años de edad, diagnosticado de leucemia mieloblástica aguda. A los 15 días post-quimioterapia, el paciente acudió al Servicio de Oncología por presentar, desde hacía unas horas, fiebre termometrada de 39°C, artromialgias intensas y lesiones cutáneas generalizadas. El paciente refería que había tomado como profilaxis tratamiento antifúngico con fluconazol. A la exploración en el momento del ingreso, presentaba fiebre de 39,2°C, aftas bucales, y afectación del estado general. La palpación abdominal y la radiografía de tórax no mostraron signos patológicos. Se procedió a la retirada del catéter de Hickman, que junto a dos extracciones de sangre fueron remitidos al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y micológico. A las 36 horas de incubación, crecieron a partir de los dos hemocultivos y de la punta de catéter unas colonias blanquecinas que se correspondían con el hongo objeto de este control.

Se solicitó a los laboratorios participantes la **identificación** de la cepa remitida y la realización, si procedía, del **estudio de sensibilidad**, así como que formularan los **comentarios** que consideraran oportunos.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN MICOLÓGICA

La cepa problema fue enviada a los 223 laboratorios participantes, de los que 206 remitieron hoja de respuesta, todos ellos con resultados valorables. El porcentaje de participación fue del 92,4%, similar al control M-1/11 (entonces fue del 91,8%), en el que se remitió una cepa de *Candida parapsilosis*.

La gran mayoría de los participantes identificaron correctamente la especie como *C. krusei* (97,6%). Hubo dos laboratorios (0,9%) que se limitaron a aportar una identificación genérica mientras que otro laboratorio (0,5%) informó *Candida no albicans*. El resto de identificaciones se detallan en la tabla 1. El Programa de Control de Calidad sólo consideró válida la identificación de especie *C. krusei*, informada por el laboratorio de referencia, el cual realizó una batería bioquímica comercial (API ID 32C y Vitek, bioMérieux), una espectrometría de masas (Maldi-Tof), y una posterior secuenciación. Además, y como es norma habitual, fueron revisados todos los lotes de líofilos por parte del Programa de Control de Calidad antes de realizar el envío, no encontrándose contaminación en ninguno de ellos.

**Tabla 1. Resultados de la identificación micológica.**

Identificación	Número	%
<i>Candida krusei</i>	201	97,6
Género <i>Candida</i>	2	0,9
<i>Candida glabrata</i>	1	0,5
<i>Candida no albicans</i>	1	0,5
Género <i>Prototheca</i>	1	0,5
Total	206	100,0

Por lo que respecta a los métodos empleados en la identificación, las galerías de pruebas bioquímicas comerciales (API, Vitek, etc.), fueron la técnica mayoritariamente utilizada por los participantes (174 centros, 84,5%), de los que 149 (72,3%) lo hicieron de forma única. Los cultivos en medios cromogénicos fueron informados por 35 participantes (17,0%), 14 de ellos (6,8%) como único método empleado. Por último, la espectrometría de masas fue utilizada por 19 laboratorios (9,2%), de los que 12 (5,8%) informaron exclusivamente este método. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 2.

**Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.**

Métodos	Número	%
Pruebas bioquímicas	149	72,3
Cultivo cromogénico + Pruebas bioquímicas	19	9,2
Cultivo cromogénico	14	6,8
Espectrometría de masas	12	5,8
Espectrometría de masas + Pruebas bioquímicas	5	2,4
Características morfológicas + Técnicas moleculares	1	0,5
Cultivo y Microscopía	1	0,5
Espectrometría de masas + Cultivo cromogénico	1	0,5
Espectrometría de masas + Pruebas bioquímicas + Cultivo cromogénico	1	0,5
Manual	1	0,5
Manual + Secuenciación	1	0,5
No informa del método empleado	1	0,5
Total	206	100,0

La tabla 3 resume las marcas y sistemas comerciales empleados para la identificación bioquímica. Las distintas galerías bioquímicas API® de bioMérieux fueron, en conjunto, el sistema mayoritariamente empleado (81 centros, el 46,6%), con un porcentaje de acierto en conjunto del 98,8% de las ocasiones (de los 36 centros que utilizaron el API 20

C AUX®, sólo uno informó erróneamente *Candida glabrata*). Le siguió en frecuencia el sistema Vitek® de bioMérieux, usado por un 41,7% de los participantes, obteniéndose un índice de aciertos excelente (100,0%). Otros sistemas menos utilizados fueron: la galería Auxacolor® de Bio-Rad (informada por el 5,2% de los participantes y también con un 100,0% de aciertos) y el sistema Microscan® (usado por el 2,9% de los centros con un 80,0% de aciertos, ya que uno de los cinco centros que utilizó este sistema comercial informó género *Prototheca*). Respecto a las galerías Rapid Yeast Plus® de Remel y Candifast® de Oxoid, fueron empleadas por muy pocos centros, por lo que no es posible obtener conclusiones sobre su eficiencia real para la identificación de esta cepa.

**Tabla 3. Sistemas comerciales de pruebas bioquímicas.**

Método comercial	Número (%)	Acierto (%)
Galerías API (bioMérieux)		
API 20 C AUX	36 (20,6)	35 (97,3)
API ID 32 C	32 (18,4)	32 (100,0)
API <i>Candida</i>	3 (1,7)	3 (100,0)
API no especificado	10 (5,7)	10 (100,0)
Vitek (bioMérieux)	72 (41,7)	72 (100,0)
Auxacolor (BioRad)	9 (5,2)	9 (100,0)
Microscan (Siemens)	5 (2,9)	4 (80,0)
bioMérieux <sup>a</sup>	2 (1,1)	2 (100,0)
Rapid Yeast Plus (Remel)	2 (1,1)	2 (100,0)
Candifast (Oxoid)	1 (0,5)	1 (100,0)
No informan	2 (1,1)	2 (100,0)
Total	174 (100,0)	172 (98,9)

<sup>a</sup>No especifica si es API o Vitek.

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

De los 206 centros que remitieron hoja de respuesta con resultados valorables, 168 (81,6%) realizaron el estudio de sensibilidad. Algunos de los restantes 38 laboratorios que no llevaron a cabo el antifungigrama indicaron que remitirían la cepa a un centro de referencia. Como puede observarse en la tabla 4, la tendencia mayoritaria fue determinar la CMI mediante un método de microdilución en caldo, que se usó por el 68,5% de los participantes y, de forma exclusiva, por el 65,5% de los mismos. En segundo lugar, destaca la determinación de la CMI mediante el E-test®, que fue realizado por el 19,6% de los centros, de los cuales un 11,9% fue la única técnica empleada. Por último, el método de concentraciones críticas fue empleado por el 11,9% de los participantes, mientras que el método de disco-placa se informó únicamente por el 7,7% de los centros que realizaron antifungigrama (tabla 4).

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

Método	Número	%
CMI <sup>a</sup>	110	65,5
E-test®	20	11,9
Concentraciones críticas	19	11,3
Disco-placa + E-test®	9	5,3
CMI <sup>a</sup> + E-test®	4	2,4
Disco-placa	4	2,4
CMI <sup>a</sup> + Concentraciones críticas	1	0,6
No especificado	1	0,6
Total	168	100,0

<sup>a</sup>CMI por microdilución en caldo.

Respecto a las marcas empleadas para realizar las CMIs o las concentraciones críticas, el sistema comercial más utilizado fue el Sensititre® (50,4%), seguido del Vitek® YBC (34,1%) y del ATB-Fungus® (8,9%), ambos de bioMérieux (tabla 5).

**Tabla 5. Marcas empleadas en el antifungigrama para CMI o concentración crítica.**

Marca	Número	%
Sensititre® (Izasa)	68	50,4
Vitek® YBC (bioMérieux)	46	34,1
ATB-Fungus® (bioMérieux)	12	8,9
Fungitest® (Bio-Rad)	7	5,2
Candifast® (Oxoid)	1	0,7
No especifican	1	0,7
Total	135	100,0

El laboratorio de referencia empleó el método de dilución en caldo de Sensititre® para la determinación de la CMI, basándose para su interpretación en los criterios recogidos en el documento M27-S3 del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para el género *Candida* y para los siguientes antifúngicos: 5-fluorocitosina, anidulafungina, caspofungina, fluconazol, itraconazol, micafungina y voriconazol. Respecto a la anfotericina B, el centro de referencia utilizó los puntos de corte del EUCAST para este antifúngico.

Los resultados obtenidos por el centro que actuó como laboratorio de referencia se especifican en la tabla 6. 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.

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

Antifúngico	CMI <sup>a</sup>	Interpretación <sup>b</sup>
5-Fluorocitosina	4/8	S/I
Anfotericina B	0,5	S
Anidulafungina	0,125	S
Caspofungina	0,5	S
Fluconazol	32	R
Itraconazol	0,5	SDD
Micafungina	0,125	S
Posaconazol	0,5	S
Voriconazol	0,5	S

<sup>a</sup>CMI expresada en µg/ml. <sup>b</sup>S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente; SDD: sensible dependiente de la dosis.

La CMI obtenida por el laboratorio de referencia en el caso de fluconazol fue de 32 µg/ml. Dicha CMI, según los puntos de corte del CLSI, debería interpretarse como "Sensible Dependiente de la Dosis", pero hay que tener en cuenta que *Candida krusei* presenta resistencia intrínseca al fluconazol, por lo que la interpretación final fue de "Resistente". La CMI de la 5-fluorocitosina osciló entre 4 µg/ml ("Sensible") y 8 µg/ml ("Intermedio") en ensayos repetidos, por lo que ambas interpretaciones fueron aceptables por parte del Control.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

En este control, como ya sucedía también en el control de Bacteriología trimestral, se solicitó por primera vez a los participantes que informasen que puntos de corte utilizaron para la interpretación del antifungigrama. De los 168 laboratorios que realizaron antifungigrama, 126 (75,0%) utilizaron los criterios del CLSI, otros 21 (12,5%) los del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), 13 (7,7%) según la bibliografía, 4 (2,4%) utilizaron los puntos de corte recomendados por su sistema comercial (Vitek, ATB-Fungus, o Fungitest) desconociendo qué criterios seguían, 2 (1,2%) utilizaron los criterios CLSI para unos antifúngicos y los de EUCAST para otros, mientras que 1 centro (0,6%) especificó que "se interpretan para la especie de levadura aislada" sin aportar mayor información. Por último, un centro (0,6%) que respondió de forma manual no aporta información al respecto (tabla 7).

**Tabla 7. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.**

Marca	Número	%
CLSI	126	75,0
EUCAST	21	12,5
Bibliografía	13	7,7
Según interpretación del sistema comercial	4	2,4
CLSI y EUCAST	2	1,2
Según especie aislada	1	0,6
No informa	1	0,6
Total	168	100,0

La tabla 8 resume los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad a los antifúngicos. En total, se recibieron resultados correspondientes a 14 antifúngicos diferentes, aunque sólo se detallan los que fueron referidos por 15 ó más participantes que, en este caso, coinciden con los aportados por el laboratorio de referencia.

Como se observa en la tabla 8, la interpretación de los resultados obtenidos con los distintos antifúngicos, en comparación con los aportados por el laboratorio de referencia, muestra unos porcentajes de concordancia que oscilan entre el 27,6% (en el caso del itraconazol) y el 96,0% (para la anidulafungina). Algunos laboratorios no interpretaron los resultados cuantitativos obtenidos, ya que no existen puntos de corte establecidos para algunos de los antifúngicos estudiados.

Analizados los resultados de los participantes desde un punto de vista general, si bien hay bastante concordancia con los aportados por el laboratorio de referencia, existen algunos puntos que requieren un comentario. En el caso del fluconazol, la mayoría de laboratorios consideraron la cepa como "Resistente", aportando un amplio rango de CMI, que iban desde ≤8 (en un único centro) a >256 µg/ml (7 centros). Hay nueve centros que la interpretaron como "Sensible Dependiente de la Dosis", otros seis como "Intermedio" e incluso un laboratorio como "Sensible", sin tener en cuenta la resistencia intrínseca que presenta esta especie al fluconazol.

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

Antifúngico	Número	Interpretación <sup>a</sup>				
		Sensible	Intermedio	Resistente	SDD <sup>b</sup>	No interpreta
Fluconazol	160	1 (0,6)	6 (3,8)	137 (85,6)	9 (5,6)	7 (4,4)
Anfotericina B	156	142 (91,0)	0	5 (3,2)	0	9 (5,8)
Voriconazol	154	140 (90,9)	1 (0,6)	3 (2,0)	0	10 (6,5)
Caspofungina	134	118 (88,0)	6 (4,5)	4 (3,0)	0	6 (4,5)
5-fluorocitosina	115	24 (20,8)	66 (57,4)	13 (11,3)	4 (3,5)	8 (7,0)
Itraconazol	87	10 (11,5)	17 (19,6)	27 (31,0)	24 (27,6)	9 (10,3)
Anidulafungina	74	71 (96,0)	0	0	0	3 (4,0)
Micafungina	69	63 (91,3)	0	0	0	6 (8,7)
Posaconazol	61	38 (62,3)	0	3 (4,9)	0	20 (32,8)

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antifúngico.

<sup>b</sup>SDD: Sensible Dependiente de la Dosis.

Con respecto a la 5-fluorocitosina, existe mayor variabilidad en cuanto a la interpretación de resultados, pues el 20,8% informa la cepa como sensible y el 57,4% como de sensibilidad intermedia. Dado que la mayoría de las CMI's obtenidas presentaba valores entre 4 µg/ml y 16 µg/ml, y que la diferente interpretación viene determinada por una sola dilución, se aceptaron como válidas ambas opciones, aunque el laboratorio de referencia informó una sensibilidad intermedia para este antibiótico.

El itraconazol es el antifúngico que presenta una mayor discordancia de resultados con respecto al aportado por el laboratorio de referencia, ya que un 31,0% de los centros informaron resistencia a este fármaco, mientras que un 27,6% lo interpretó como "sensible dependiente de la dosis" y un 19,6% como que presentaba una sensibilidad "intermedia". Las CMI que informaron la mayoría de los centros oscilaban entre 0,25 y 0,5 µg/ml.

Finalmente, los resultados para el resto de los antifúngicos fueron mayoritariamente concordantes con el laboratorio de referencia.

#### 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, se obtuvieron los siguiente datos: 196 (95,1%) centros comentan no utilizarlo, 2 (1,0%) afirman el haberlo usado, y 8 lo utilizaron parcialmente (3,9%).

#### COMENTARIOS

La mayoría de comentarios se referían a que *C. krusei* presentaba una resistencia intrínseca al fluconazol. Para el tratamiento muchos centros aconsejaban una terapia prolongada con equinocandinas, anfotericina B, o bien, con voriconazol (si bien, algunos laboratorios preferían el no administrar ningún tipo de azoles en las infecciones causadas por *C. krusei* pues no se habría demostrado su eficacia).

Otros comentarios se referían a que la profilaxis con fluconazol al paciente del caso habría seleccionado especies de *Candida* resistentes al mismo.

Por último, algunos participantes especificaron que si bien habían utilizado los puntos de corte CLSI para la mayoría de antifúngicos, para la anfotericina B emplearon los de EUCAST.