

Desde el primer caso documentado de candidosis (candidiasis) profunda, publicado en 1861, la frecuencia de este tipo de infecciones no fue muy relevante hasta mediados del siglo XX. Fue en la década de los años 40, coincidiendo con la introducción de los tratamientos antimicrobianos, cuando se observó un aumento considerable de la incidencia de todo tipo de candidosis, tanto profundas como superficiales. En la actualidad, constituyen el cuarto grupo de microorganismos recuperados en el hemocultivo en los Estados Unidos. De las más de 150 especies diferentes del género *Candida*, tan sólo unas pocas son habitualmente causantes de infecciones humanas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, y *Candida glabrata*.

El aumento significativo de las infecciones profundas por levaduras en los últimos años es debido, en la mayoría de las veces, a causas yatrogénicas. Las medidas de soporte vital, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, la implantación de material protésico, los implantes de órganos, la prematuridad, la corticoterapia y, en general, cualquier tipo de inmunosupresión (terapéutica o adquirida), son la causa de las candidosis invasoras en nuestros días.

Sin el tratamiento adecuado, la mortalidad de las candidosis sistémicas supera el 90%, lo que unido a los costos de hospitalización que este tipo de infecciones genera, las convierten en entidades de gran trascendencia en la práctica diaria en el medio hospitalario.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El microbiólogo clínico juega un decisivo papel en el diagnóstico etiológico de las candidosis profundas. Aunque el cultivo y la identificación del agente causal constituyen las técnicas clásicas para realizar un diagnóstico microbiológico, actualmente se están introduciendo nuevas alternativas con gran fiabilidad.

De todas las técnicas microbiológicas, el hemocultivo es, sin lugar a dudas, el mejor método diagnóstico de las micosis sistémicas. Desgraciadamente no es un método perfecto ya que las levaduras necesitan más tiempo de incubación que las bacterias para detectar su crecimiento y, además, debido a su gran tamaño, suelen circular transitoriamente en sangre periférica, dificultando su recuperación en un hemocultivo, por lo que la sensibilidad global del hemocultivo se sitúa alrededor del 50%. A pesar de ello, sigue siendo la mejor herramienta diagnóstica disponible.

Independientemente del sistema de hemocultivo automatizado que se utilice, el volumen de sangre inoculada en cada frasco es fundamental para garantizar un rendimiento adecuado de la técnica. Se recomienda inocular un volumen no inferior a 10 ml por cada botella de hemocultivo, siendo lo ideal realizar tres extracciones seriadas para minimizar, en lo posible, las fungemias intermitentes. Aunque la mayoría de estas levaduras se detectan en un hemocultivo antes del cuarto día de incubación, cuando existe sospecha de candidemia, es necesario mantener los cultivos durante 30 días y realizar subcultivos ciegos antes de informarlo como negativo.

La mayoría de las especies fúngicas crecen adecuadamente en los frascos de hemocultivo convencionales para bacterias, pero en la actualidad disponemos ya de frascos específicamente diseñados para favorecer el crecimiento de levaduras y hongos miceliares como el Mycosis IC/F → (Becton Dickinson).

La técnica de lisis-centrifugación constituye una alternativa al hemocultivo automatizado, aportando ciertas ventajas teóricas para la recuperación de células fúngicas del torrente sanguíneo. El fundamento de la misma es sencillo: la sangre extraída se introduce en un tubo especial donde se pone en contacto con sustancias líticas que rompen los leucocitos, liberando a los posibles microorganismos intracelulares, posteriormente se centrifuga el tubo y el sedimento se siembra en diferentes medios de cultivo sólidos, dependiendo del microorganismo sospechado. Entre sus ventajas destacan la posibilidad de cuantificar la infección, ya que el volumen del inóculo es siempre conocido, y la neutralización de antimicrobianos o sustancias inhibitorias presentes en la sangre. También hay que tener en cuenta entre sus inconvenientes la laboriosidad de la técnica, comparada con los sistemas automáticos y la mayor proporción de contaminaciones, si el personal no está convenientemente entrenado.

Ante la sospecha de una micosis invasora, además del hemocultivo, también podemos procesar otro tipo de muestras, dependiendo del cuadro clínico. Para ello, las muestras estériles, tanto las obtenidas mediante aspiración con aguja fina (PAAF) como los líquidos orgánicos, son las más adecuadas.

El procesamiento de las muestras en Micología es similar al empleado en Bacteriología, pero debemos recordar la importancia de la centrifugación previa, o del troceado con bisturí en el caso de tejidos, para aumentar la sensibilidad de la observación directa y del cultivo. La observación microscópica directa de toda muestra remitida para su estudio micológico es una técnica sencilla y recomendable, ya que permite el diagnóstico presuntivo en muchas ocasiones. El mayor tamaño de las células fúngicas permite, a diferencia de las bacterias, su observación a bajos aumentos en las muestras sin fijar mediante el examen en fresco con potasa, que reblandece la muestra y facilita su observación. También podemos utilizar *blanco de calcoflúor*, que se une específicamente a la quitina de las células fúngicas y nos ayuda a su observación mediante microscopía de fluorescencia. Por otra parte, aunque las levaduras se tiñen bien con la mayoría de los colorantes bacterianos, también disponemos de tinciones

específicas (como son las de plata, el PAS o las de inmunoperoxidasa) que nos permiten su visión bien diferenciada.

En la actualidad, debido al diferente grado de sensibilidad de las distintas especies de *Candida*, es aconsejable la identificación de especie de toda levadura aislada en una muestra clínica profunda. Para identificarlas, disponemos de técnicas relativamente rápidas para las especies patógenas más frecuentes, como son: el test de filamentación para *C. albicans*, las técnicas de látex con anticuerpos monoclonales (Bichrolatex *Candida*→), o pruebas enzimáticas (Fungiscreen→ , Rapidec→). Los medios de cultivo cromogénicos (CHROMagar→ , *Candida* ID→ , etc.) "tiñen" las colonias de un determinado color según la especie de levadura permitiendo su diferenciación en casos de cultivos mixtos. Sin embargo, las pruebas de asimilación de azúcares (API 20C→ , Auxacolor→ , etc.) continúan siendo las técnicas más utilizadas en la mayoría de los laboratorios para la identificación definitiva de las distintas especies de levaduras.

Independientemente del cultivo, disponemos de otras técnicas basadas en la detección de componentes fúngicos para el diagnóstico de las micosis sistémicas. Entre las más utilizadas, por su contrastado valor, se encuentran la detección de antígeno de *Cryptococcus neoformans*, tanto en el suero como en el LCR, mediante la aglutinación con látex. Desgraciadamente, el diagnóstico serológico de las candidemias aún no se ha desarrollado plenamente, siendo, hasta el momento, la detección de anticuerpos antimicelio (no comercializada) la única que ha demostrado cierta correlación con la evolución clínica de estos pacientes.

Como era de esperar, el diagnóstico molecular se ha convertido en una alternativa válida para el diagnóstico de las candidemias, permitiendo la detección precoz y rápida de *Candida*, la identificación de especie en un tiempo corto (bien en la misma muestra, bien en el cultivo) y el control de la respuesta clínica al tratamiento. Hasta el momento, los resultados obtenidos por los diversos autores son similares, oscilando entre un 90 a 100% de sensibilidad y cerca de un 100% de especificidad en todos ellos; sin embargo, todavía son técnicas experimentales que deben ser contrastadas con los métodos clásicos y la evolución clínica de los pacientes.

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Hasta 1983 la comunidad científica no se interesó por la normalización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Por aquel entonces, el impacto de las infecciones fúngicas en enfermos con sida o inmunodeprimidos y la aparición de las primeras resistencias a los azoles, movió al NCCLS a la creación de un comité para establecer unas condiciones de trabajo normalizadas (medio de cultivo, inóculo, incubación, etc.). Los esfuerzos de este comité junto con los de docenas de grupos de trabajo culminaron en 1997 con la publicación del documento M27-A, donde se estandarizan las técnicas de macro y microdilución para las levaduras. Aplicando esta metodología se obtiene una reproducibilidad intra e interlaboratorio similar a la conseguida con los antibacterianos.

La lectura de la técnica de microdilución no plantea dificultad con la anfotericina B, la CMI corresponderá a la concentración más baja con inhibición completa de crecimiento. Por el contrario, con los azoles se observa cierta inhibición parcial del crecimiento (*trailing zone*) que puede dificultar su lectura, considerándose como CMI aquella concentración donde se observe una reducción del crecimiento del 80% respecto al control sin antifúngicos. Para la lectura de la microdilución es aconsejable el empleo de un espectrofotómetro aunque también puede realizarse visualmente.

Debido a la complejidad de estas técnicas de referencia, reservadas a casos muy concretos y a la investigación, en la práctica diaria podemos recurrir a diferentes alternativas ya comercializadas. En la actualidad disponemos de diferentes métodos para valorar la sensibilidad de los antifúngicos, tanto de difusión como de dilución.

Entre los métodos de difusión destaca el comercializado con el nombre de Neo-Sensitab→ (Rosco Diagnostica) con el que se pueden evaluar hasta 21 antifúngicos diferentes. Permite la configuración de los antifungigramas según el interés terapéutico concreto y su realización similar a los antibiogramas convencionales para bacterias. Además, la buena estabilidad de las tabletas a temperatura ambiente (a excepción de la anfotericina B) es una ventaja adicional.

El E-test→ (AB Biodisk) es otra técnica de difusión de fácil realización y que proporciona los resultados con datos de la CMI. Posee buena concordancia con los métodos de referencia; sin embargo, su lectura presenta ciertas dificultades, en particular con *C. albicans*.

Entre las técnicas comercializadas de dilución destaca la microdilución colorimétrica (Yeast One→ Sensititre,) que utiliza el mismo principio de la microdilución clásica pero incorpora en los pocillos un indicador que cambia de color cuando se produce crecimiento. La lectura de la CMI es más sencilla y el fenómeno de *trailing zone* con los azoles se observa menos frecuentemente. Este método incorpora en las microplacas a los cinco antifúngicos más utilizados en infecciones sistémicas (anfotericina B, 5 fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol e itraconazol).

Fungitest→ (Sanofi Pasteur) es otra técnica que utiliza una galería de pocillos con dos concentraciones diferentes de antifúngicos y proporciona los resultados como sensible, intermedio o resistente. Su realización es muy sencilla, incorpora los cinco antifúngicos anteriormente citados y es asequible a cualquier laboratorio.

RESISTENCIAS A LOS ANTIFUNGICOS

Con el advenimiento de una metodología estandarizada y de sus alternativas comercializadas, cada vez son más numerosas las publicaciones sobre sensibilidad a los antifúngicos, lo que nos permite conocer mejor la situación actual de las resistencias a estos fármacos, tanto de las levaduras como de los hongos filamentosos.

Por resistencia *intrínseca* debe entenderse la ausencia de sensibilidad de una determinada especie hacia un determinado antifúngico. Resistencia *primaria* es la que presentan determinadas cepas de una especie a un antifúngico de forma natural (sin exposición previa), mientras que resistencia *secundaria* es la adquirida como resultado del contacto del hongo con esa sustancia.

Entre los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de resistencias a los antifúngicos se incluyen las alteraciones de la membrana celular, los defectos enzimáticos, el aumento de la síntesis de compuestos que compiten con el antifúngico y las alteraciones en las estructuras dianas. La base genética de la resistencia radica, sobre todo, en mutaciones cromosómicas concretas, aunque también se han descrito mutaciones extracromosómicas.

Pero, ¿cuál es la situación actual de la resistencia?. La mayoría de los hongos patógenos oportunistas son inhibidos *in vitro* por concentraciones de **anfotericina B** inferiores a 1 mg/L (alcanzadas en plasma con las dosis habituales). La resistencia secundaria es excepcional en levaduras y siempre ha sido descrita en especies distintas de *C. albicans*. Afortunadamente, la repercusión de ese tipo de resistencia no es muy grande ya que los cambios asociados a ella también reducen la virulencia de la cepa y el crecimiento de los mutantes, haciéndose más vulnerable a los mecanismos defensivos del huésped. Entre las especies que más fácilmente desarrollan resistencia secundaria a anfotericina B destaca *C. parapsilosis*, seguida de *C. tropicalis* y *C. lusitanae*. Por otra parte, las especies haploides, como *C. guilliermondi* y *C. glabrata* pueden expresar más fácilmente las mutaciones de resistencia.

La resistencia intrínseca a **5-fluorocitosina** es excepcional y la resistencia primaria es muy variable, según la especie. Pero, sin lugar a dudas, la resistencia secundaria es el mayor inconveniente de este antifúngico cuando se utiliza como monoterapia. Su incidencia varía según el tipo de infección, llegando hasta el 50% en las infecciones mucocutáneas crónicas. Por lo tanto, la repercusión clínica es notable, constituyendo el único problema grave de resistencia a los fármacos antifúngicos, ya que cualquier especie sensible puede desarrollarla. Esta situación, unida a la sinergia observada entre la 5-fluorocitosina y la anfotericina B, o con los azoles, ha motivado que su uso actualmente sea siempre en combinación con otro antifúngico, y nunca sola.

La resistencia primaria a los **azoles** es difícil de establecer debido al uso generalizado de estos compuestos, tanto por vía oral como tópica, por lo que no se puede descartar, muchas veces, un contacto previo. La resistencia secundaria en las personas inmunocompetentes se observa muy raramente, siendo *C. glabrata* la especie implicada casi siempre. Por el contrario, en los inmunodeprimidos es cada vez más frecuente; sobre todo, después del tratamiento prolongado de la candidosis mucocutánea con ketoconazol o fluconazol. La repercusión clínica de esta resistencia no ha sido fácil de evaluar hasta ahora, debido a las discrepancias en los métodos empleados. En las candidosis vaginales se ha observado una creciente frecuencia de las especies menos sensibles (*C. tropicalis*), o de las que desarrollan resistencia con más facilidad (*C. glabrata*). Los pacientes con candidosis mucocutánea crónica desarrollan resistencia a ketoconazol después del tratamiento prolongado. Afortunadamente, las candidemias por cepas resistentes a los azoles son muy infrecuentes; en los enfermos inmunocompetentes son excepcionales. Sin embargo, en los pacientes neutropénicos, la profilaxis con fluconazol ha originado un aumento de fungemias por *C. krusei* o *C. glabrata* resistentes a este grupo de fármacos. Pero es en el grupo de enfermos con sida, sobre todo en aquéllos con recuentos de linfocitos CD4 inferiores a 50 células/ μ L, donde se ha descrito más casos de candidosis digestiva por cepas de *C. albicans* resistentes a los azoles motivados por la larga duración del tratamiento.

Como ocurrió con los antibacterianos, los estudios de sensibilidad a los antifúngicos quedarían incompletos si no se complementan con estudios de respuesta clínica o de correlación entre actividad *in vitro* y eficacia *in vivo*. La necesidad de realizar estos estudios de correlación viene dada por la existencia de otros factores, además de la CMI, que influyen notablemente en la evolución del proceso infeccioso (farmacocinética, condiciones generales del paciente, localización de la infección, características propias del patógeno, etc.). Todo ello lleva consigo a una doble realidad: i) la sensibilidad *in vitro* debe guiar el comienzo de un tratamiento antifúngico, pero no es una garantía de éxito y ii) la resistencia *in vitro* suele predecir el fracaso terapéutico.

La presencia cada vez más frecuente de especies resistentes al tratamiento antifúngico, hace necesario la realización rutinaria de pruebas de sensibilidad a toda cepa causante de una candidemia invasora o que procede de enfermos inmunodeprimidos. Por otra parte, estos datos de sensibilidad serán muy útiles a la hora de orientar futuros tratamientos empíricos y para valorar epidemiológicamente las resistencias a los antifúngicos.

La posibilidad de utilizar técnicas comerciales facilita una tarea que debe ser habitual en un laboratorio de microbiología clínica. Además, los nuevos métodos estandarizados para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos nos permiten conocer la realidad de cada centro, así como observar la evolución de las resistencias según la especie y el área geográfica.

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27-A. NCCLS, Villanova, Pa 1997.

Beck-Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993; 167:1247-1251.

Bodey GP, Bowden RA, Büchner T, Pauw BE, Filler SG, Ghannoum M, Glauser M, Herbrecht R, Kauffman CA, Kohno S, Martino P, Meunier F, Mori T, Pfaller MA, Rex JH, Rogers TR, Rubin RH, Solomkim J, Viscoli C, Walsh TJ, White M. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. Clin Infect Dis 1997; 25:43-59.

Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik JA, Enhelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 1997; 35:1353-1360.

Martínez-Suarez JV, Rodríguez-Tudela JL. La resistencia a antifúngicos en los hongos patógenos oportunistas (II). Imidazoles y triazoles. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996; 14:490-500.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 31:327-332.