



¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?

Manuel Cuenca-Estrella y Juan Luis Rodríguez-Tudela

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

Resumen

El desarrollo de métodos fiables para la detección de resistencia *in vitro* junto con el aumento de micosis por cepas o especies fúngicas que presentan resistencia intrínseca o secundaria a los antifúngicos, han hecho aumentar la importancia clínica de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. La cuestión que muchos expertos se plantean en la actualidad es si pueden basarse las indicaciones de los diferentes antifúngicos, en los resultados obtenidos con los estudios de sensibilidad disponibles. En este artículo se analizan la fiabilidad de las pruebas de detección de resistencias *in vitro*, su correlación con el fracaso terapéutico y, por último, la utilidad real de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

Palabras clave

Antifúngicos, Estudios de sensibilidad, Utilidad clínica

Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing?

Summary

The development of reliable procedures for detecting resistance *in vitro* to antifungal agents and the increase in the prevalence of mycoses due to organisms with intrinsic or secondary resistance have reinforced the clinical relevance of antifungal susceptibility testing. A matter is currently in the limelight: can antifungal agents indications be based on susceptibility testing results? The present paper reviews the reliability of susceptibility testing procedures available at the moment, their capability for predicting therapeutic failure, and their clinical usefulness.

Key words

Antifungal agents, Susceptibility testing, Clinical usefulness

En las últimas décadas se han producido cambios sustanciales en el mundo de la Micología médica [1]. En primer lugar, los avances diagnósticos, quirúrgicos y farmacológicos iniciados a finales de los años 1960 revolucionaron la Medicina moderna, ya que empezaron a tratarse con éxito enfermedades que habían sido tradicionalmente incurables. Como contraprestación, estos avances hicieron aumentar las complicaciones iatrogénicas entre las que se cuentan las infecciones oportunistas. Microorganismos saprofitos o ambientales de escasa virulencia, como *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., se convirtieron en patógenos que podían causar cuadros infecciosos mortales [2]. Este aumento de prevalencia de las micosis hizo necesario desarrollar fármacos con los que poder tra-

tar estas infecciones. Los polienos, la fluorocitosina y los imidazoles empezaron a utilizarse con frecuencia en muchos grupos de enfermos y con el desarrollo de los triazoles (fluconazol e itraconazol), se inició el uso masivo de la profilaxis antifúngica y de la terapia empírica [3,4].

Estas prácticas terapéuticas han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca [5,6].

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencias *in vitro*, que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos [7]. Por eso parece cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. Además, desde la aparición de nuevas moléculas antifúngicas (candinas, sordarinas...) y de nuevas estrategias terapéuticas (presentaciones lipídicas de los polienos, terapia combinada...), la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica u otra [8].

La cuestión que muchos expertos se plantean en la actualidad es si pueden basarse las indicaciones de los diferentes antifúngicos, en los resultados obtenidos con los estudios de sensibilidad disponibles. En este artículo se analizan la fiabilidad de las pruebas de detección de resistencias *in vitro*, su correlación con el fracaso terapéutico y por último, la utilidad real de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

Dirección para correspondencia:

Dr. Manuel Cuenca-Estrella
Servicio de Micología
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2
28220 Majadahonda (Madrid), España
Tel.: + 34 91 509 7961
Fax: + 34 91 509 7966
E-mail: mcuenca-estrella@isciii.es

Técnicas para realizar los estudios de sensibilidad

En la década de los años 1980, varias sociedades microbiológicas y grupos de investigadores de diversos países empezaron a interesarse por el desarrollo de técnicas para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Este interés se vio plasmado en trabajos multicéntricos que sirvieron para establecer métodos de referencia para los estudios de sensibilidad [9-13]. La mayoría de estos métodos emplean técnicas de dilución en caldo y se basan en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la determinación de porcentajes de inhibición, con relación a un control de crecimiento.

Dentro de los métodos de referencia destacan los recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [9,14]. Esta institución estadounidense ha aprobado un estándar para realizar estudios de sensibilidad en levaduras (documento M27-A) y ha propuesto otro, para hongos miceliales productores de conidias (documento M38-P). Estos estándares describen técnicas de macro y microdilución para determinar la CMI, entre cuyas principales características se incluyen un método espectrofotométrico para la preparación del inóculo, RPMI a pH 7 como medio de cultivo, la utilización de antifúngicos en forma de polvo valorado, la lectura visual de los tubos o de las placas, el cálculo de la CMI por porcentajes de inhibición y recomendaciones para controlar la calidad de los resultados [15].

Los estándares del NCCLS constituyen los métodos de referencia más difundidos y que más se han utilizado para realizar estudios de correlación con la clínica, por lo que constituyen el *gold standard* de las técnicas de sensibilidad. Sin embargo estos métodos muestran algunas limitaciones, que han intentado superarse mediante la inclusión de modificaciones [7,8,16]. Así han aparecido otros métodos de referencia que algunos autores engloban con el término de técnicas NCCLS-like [8,17]. Este es el caso del método propuesto por el European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) de la de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas [7,8,13]. El estándar del EUCAST se basa en el documento M27-A del NCCLS y propone algunas modificaciones para determinar la CMI de las levaduras. Entre las modificaciones destacan el suplemento del RPMI con 18 gramos/litro de glucosa (RPMI-2%), el aumento del tamaño del inóculo (1.5×10^7 UFC/ml) y la lectura espectrofotométrica. Con estas modificaciones se pretende acortar el periodo de incubación necesario para obtener la CMI (de 48h a 24h) y prescindir de la subjetividad de la lectura visual para calcular los porcentajes de inhibición [18,19]. Las CMIs obtenidas mediante el método del EUCAST muestran una elevada correlación con las obtenidas por el NCCLS (>85%), por lo que este método puede constituir una alternativa semi-automatizada para realizar estudios de sensibilidad [18,20].

Otros autores y otros grupos de investigadores han propuesto nuevas modificaciones de los métodos de referencia, con la intención de conseguir técnicas que puedan emplearse con especies de crecimiento lento como *Cryptococcus neoformans* y otros basidiomicetales, microorganismos para los que los métodos de referencia actuales no son muy fiables. Así se han analizado alternativas como sustituir el medio RPMI por medio con base de nitrógeno para levaduras (YNB) o incubar los tubos o las placas en agitación constante [21-23].

Asimismo, otros trabajos recomiendan modificaciones para mejorar la discriminación entre cepas sensibles y resistentes, sobre todo en los casos en los que existe

el fenómeno del *trailing* (crecimiento residual) con los antifúngicos no fungicidas. Así se ha valorado disminuir el pH del medio a 5, modificar la molaridad del medio, determinar la CMI a las 24 h o utilizar sistemas de lectura automatizados [24-27].

A pesar de las limitaciones, los estándares del NCCLS, del EUCAST y los métodos NCCLS-like son métodos reproducibles y en términos generales, distinguen las poblaciones sensibles de las resistentes *in vitro* [7,8]. Estas dos características son fundamentales para que una técnica de sensibilidad sea de utilidad clínica y que por tanto, pueda emplearse para predecir el fracaso terapéutico. Sin embargo, estas técnicas estandarizadas presentan varias cuestiones sin resolver que para muchos autores constituyen barreras infranqueables a la hora de su aplicación asistencial.

En primer lugar, existen dudas sobre si estos métodos son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a la anfotericina B. Las técnicas actuales parecen no tener la capacidad suficiente para diferenciar cepas sensibles y resistentes a la anfotericina B, ya que la CMI del 99% de las cepas se incluye en un intervalo de cuatro diluciones dobles (0,12-1 mg/l). Debido a esto no pueden establecerse puntos de corte fiables para diferenciar ambas poblaciones, ya que la propia variabilidad intrínseca de las pruebas de sensibilidad hace necesario un intervalo de distribución más amplio, como ocurre en el caso del fluconazol, con el que se observan cepas de *Candida* con CMIs de 0,12-0,50 mg/l (población sensible *in vitro*) y cepas con CMIs de 16-64 mg (población resistente *in vitro*). Varios autores han propuesto métodos alternativos para la detección de la resistencia a anfotericina B. Se han evaluado técnicas de sensibilidad que incluyen medios de cultivo distintos al RPMI. Entre estos destacan el Medio para Antibiótico N° 3 (AM3) y el Iso-Sensitest, que permiten aumentar la capacidad de separación entre poblaciones [28,29]. Otros autores han propuesto utilizar técnicas distintas como la determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) o el E-test, un método basado en la difusión en agar, ya que parece que pueden detectar las cepas resistentes *in vitro* con mayor eficacia [30-32]. Por otra parte, algunos expertos creen que si las pruebas de sensibilidad no detectan cepas con CMI de anfotericina B elevada, es porque apenas existen. Su argumento se basa en el hecho de que las especies intrínsecamente resistentes como *Trichosporon asahii*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Scedosporium prolificans*, tiene una CMI de anfotericina B de >8 mg/l, incluso cuando se utilizan técnicas con RPMI como medio de cultivo [33,34].

Otra limitación de las técnicas estandarizadas es su utilidad con las especies de levaduras de crecimiento lento, como ya se indicó anteriormente. Muchas especies de levaduras no fermentadoras como *C. neoformans*, *Rhodotorula* spp., *Galactomyces* spp., *Dipodascus* spp. o *Trichosporon* spp. no crecen bien en el medio de cultivo recomendado para hacer estudios de sensibilidad, lo que tiene un efecto sobre la determinación de la CMI y más concretamente sobre su fiabilidad. Las modificaciones propuestas para soslayar esta limitación no han solucionado el problema y actualmente, los estudios de sensibilidad con estas especies son de dudosa utilidad terapéutica [35,36].

Por otra parte debe resaltarse que los métodos para los estudios de sensibilidad con hongos miceliales se encuentran más retrasados en cuanto a su estandarización, que los que se utilizan con levaduras [14,37]. Además, se han publicado diferentes trabajos en los que se pone de manifiesto que el estándar propuesto por el NCCLS (documento M38-P), que será aprobado a lo largo de 2002

(documento M38-A), puede no ser la forma más adecuada para realizar estudios de sensibilidad con estos microorganismos [38]. En primer lugar, las técnicas que se recomiendan en este documento fueron establecidas con cepas de un número limitado de especies, por lo que se tienen dudas sobre su aplicabilidad en otras, como por ejemplo aquellas especies que apenas producen conidias [39,40]. Asimismo se tienen dudas sobre la fiabilidad y adecuación de emplear un método espectrofotométrico para preparar el inóculo [41]. El tamaño y el color de las estructuras tienen una importancia capital a la hora de realizar mediciones espectrofotométricas, por lo que emplear un espectrofotómetro para medir la turbidez de una suspensión de esporas, cuyo color y tamaño son específicos de cada especie o incluso de cada cepa, puede no constituir el mejor procedimiento para preparar un inóculo de forma estandarizada. Por ello se ha propuesto emplear técnicas de recuento microscópico de esporas, que permiten preparar el inóculo de un modo reproducible [42,43]. Por otra parte, varios expertos creen que el RPMI no es el mejor medio para realizar las pruebas de sensibilidad con hongos miceliales, por ello se han propuesto alternativas, aunque se necesitan más datos antes de reconocer que puedan ser de mayor utilidad [44,45].

La cuarta limitación de los métodos de referencia y quizá la más importante es que estas técnicas no pueden ser utilizadas por la mayoría de los laboratorios asistenciales, dada su complejidad metodológica [46]. La determinación de la CMI por técnicas de dilución en caldo no es un método aplicable para laboratorios clínicos que deben hacer estudios de sensibilidad a diario, que sufren la presión asistencial y que deben ofrecer información rápida para que tenga utilidad terapéutica. Por ello se han desarrollado métodos alternativos basados en la difusión en agar o en la dilución marcada con contrastes colorimétricos. Entre estos últimos destacan dos técnicas comerciales, el Sensititre Yeast One y el ASTY. Estos dos métodos muestran una buena concordancia con los resultados obtenidos mediante los estándares del NCCLS y pueden constituir una alternativa para los laboratorios asistenciales [8,47,48]. Otras galerías, kits y sistemas comerciales basados en los procedimientos de dilución no han sido evaluados con detalle, desconociéndose su utilidad y fiabilidad, por lo que los resultados obtenidos con estos métodos deben ser tomados con precaución desde el punto de vista asistencial [7,49,50].

En cuanto a las técnicas basadas en la difusión, el Etest ha sido ampliamente evaluado tanto para levaduras como para hongos miceliales [40,51-53]. La mayoría de los trabajos publicados han demostrado una correlación aceptable con los procedimientos NCCLS o NCCLS-like, aunque se ha observado una concordancia inferior al 50%, en algunas especies de *Candida*, en *C. neoformans* y en levaduras poco frecuentes en clínica. En lo que se refiere a los estudios con discos o tabletas de antifúngicos, hasta la fecha sólo se ha observado una correlación aceptable para la CMI de fluconazol. La inundación de la placa con azul de metileno parece mejorar los resultados ya que facilita la lectura de los halos y quizá en un futuro se dispongan de datos sobre otros antifúngicos [54-56].

Para terminar este apartado debe indicarse, que algunos expertos creen que tanto los métodos colorimétricos como los de difusión en agar no deben emplearse en laboratorios asistenciales, hasta que se superen las limitaciones que muestran las técnicas de referencia. No obstante es indiscutible que estas técnicas son capaces de detectar la resistencia *in vitro* a los azoles, lo que les puede otorgar un papel a la hora de realizar recomendaciones terapéuticas [46].

Detección de resistencias y correlación con el fracaso terapéutico

Los estudios de sensibilidad *in vitro* se realizan para detectar las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos. Estos estudios ayudan a elegir la mejor alternativa de tratamiento reduciendo la posibilidad de que aparezca un fallo terapéutico. Las pruebas de sensibilidad en Micología han cobrado importancia debido a la aparición de especies patógenas con resistencia intrínseca y de cepas con resistencia secundaria. Sin embargo la correlación entre las pruebas *in vitro* de sensibilidad a los antifúngicos y la respuesta al tratamiento de los enfermos con micosis no es muy alta [7,57-59].

Se acepta que la correlación *in vitro-in vivo* es buena cuando puede predecirse la resistencia clínica mediante la detección *in vitro* de la resistencia microbiológica. Un microorganismo es microbiológicamente resistente cuando presenta variables de sensibilidad *in vitro* (CMI, CMF, cm de halos de inhibición), con valores más elevados de los que habitualmente se observan entre los miembros de su especie o de otras especies. Por ejemplo, una cepa de *C. albicans* con una CMI de fluconazol de 64 mg/l debe considerarse microbiológicamente resistente a este azol, ya que la mayoría de las cepas de *C. albicans*, así como otras especies de levaduras sensibles (*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) muestran CMI de 0,12-0,5 mg/l. Por otra parte, la resistencia clínica puede definirse como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en un foco de infección, aunque en dicho foco existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión.

Cuando existe una buena correlación entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica, se establecen puntos de corte que son los que se toman en cuenta para indicar o modificar los tratamientos con antimicrobianos. Como se indicó anteriormente, esta correlación no es muy elevada en el caso de las infecciones fúngicas. Aún así se han llevado a cabo varios estudios de correlación *in vitro-in vivo* que han permitido establecer puntos de corte para fluorocitosina, fluconazol e itraconazol, aplicables únicamente en infecciones por levaduras [60]. Tomando en cuenta estos puntos de corte, se ha observado en ocasiones una disminución de la respuesta al tratamiento cuando la cepa tiene una CMI elevada, como en las candidosis orofaríngeas por cepas resistentes *in vitro* al fluconazol. Así se ha demostrado que el fracaso terapéutico con fluconazol se asocia significativamente con cepas que presentan una CMI >64 mg/l, cuando los estudios de sensibilidad se obtienen por el método del NCCLS, una CMI >8-16 mg/l cuando se utilizan métodos NCCLS-like, y una CMI >48 mg/l cuando se emplea el Etest [60-63]. Se han observado fallos similares en enfermos tratados con itraconazol, cuando la CMI de este azol era > 0,5-1 mg/l [64].

Sin embargo no se ha encontrado una correlación tan clara en las candidosis profundas, lo que sin duda limita en gran medida la utilidad de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos [30,65]. Se han publicado pocos estudios clínicos de correlación que incluyan un número representativo de casos tratados con fluconazol y apenas existen datos sobre candidosis o infecciones profundas por levaduras tratadas con itraconazol. En general se ha observado una correlación discreta [30,60,66], si se tienen en cuenta los puntos de corte que se señalaron en el párrafo anterior, pero en ocasiones se ha descrito una correlación inversa [67]. Esto puede entenderse si se valoran las numerosas variables que influyen en la respuesta a un tratamiento antimicrobiano. Pero además en el caso de las micosis profundas por levaduras, los estudios de

correlación se han realizado con pocos enfermos, sin estratificación por enfermedad de base o dosis de antifúngico e incluyendo un número muy limitado de cepas resistentes *in vitro*. Por ello algunos autores han realizado estudios de correlación con modelos animales. Aunque siempre debe considerarse que los modelos animales no son iguales que los estudios clínicos, sí puede aceptarse que son un buen método para reproducir las infecciones humanas y por tanto, sus resultados pueden ser útiles para la práctica clínica. En el caso de las infecciones profundas por levaduras y la correlación *in vitro-in vivo* para los azoles, numerosos trabajos realizados con modelos animales han demostrado que se produce un descenso de la respuesta al fluconazol, cuando la CMI de este antifúngico en las cepas infectantes es superior a 8 mg/l. Con itraconazol se ha asociado el fallo terapéutico con CMIs $>0,25$ mg/l [64,65].

En relación con las infecciones por hongos miceliales debe indicarse que no se han propuesto puntos de corte para los azoles. No obstante en los últimos años se han comunicado fracasos terapéuticos con itraconazol, en enfermos con aspergilosis producidas por cepas que presentaban una CMI de itraconazol de 8 mg/l o superior [57,68]. Esta correlación se ha visto confirmada por estudios realizados en modelos murinos de aspergilosis pulmonar o diseminada [69].

En lo que se refiere a la anfotericina B no se han propuesto puntos de corte ni para las infecciones por levaduras ni para las infecciones por hongos miceliales. Como se señaló en el apartado anterior, existen dudas sobre la fiabilidad de las técnicas de sensibilidad para detectar la resistencia a anfotericina B y además, varias evidencias indican que la resistencia *in vitro* es un hecho poco frecuente entre las especies fúngicas. No obstante se ha demostrado la existencia de resistencia clínica a este polieno en infecciones por *Candida* spp. o por *Aspergillus* spp. [32,70,71]. El problema es que no existe un número suficiente de casos como para realizar ensayos clínicos prospectivos estratificados con potencia estadística. El único estudio clínico que ha encontrado diferencias significativas según la CMI de la cepa, es un trabajo retrospectivo realizado con enfermos con aspergilosis pulmonar [72]. Todos los casos producidos por cepas con CMI de anfotericina B < 2 mg/l evolucionaron hacia la curación, mientras que sólo sobrevivió un enfermo de 23, dentro del grupo de pacientes que tenían aspergilosis por cepas que presentaban CMI de anfotericina B ≥ 2 mg/l. Este trabajo ha sido criticado por el escaso número de enfermos analizado y por la falta de estratificación, además de por proponer unos puntos de corte poco prácticos, ya que es muy difícil distinguir mediante técnicas basadas en la CMI, poblaciones sensibles y resistentes si no están separadas por un intervalo de tres o cuatro diluciones.

Por otra parte, en los estudios realizados con modelos animales de infección fúngica, se ha observado que no existe apenas correlación entre la CMI de anfotericina B y la respuesta al tratamiento [70]. Sólo en algunos modelos murinos de candidiasis diseminada se ha encontrado una cierta relación entre la CMI y el fracaso terapéutico. Así por ejemplo en un modelo de infección por *Candida lusitanae* se observó que las cepas con CMI de anfotericina B > 2 mg/l respondían peor al tratamiento con este polieno, que las infecciones por cepas con CMIs más bajas. En este trabajo se empleó el Etest como técnica de sensibilidad [71]. En lo que se refiere a los hongos miceliales, no parece que la CMI de anfotericina B ayude a predecir la respuesta a la terapia. En varios modelos animales se ha comprobado como cepas con CMI de ≥ 2 mg/l se comportan como sensibles *in vivo* y que cepas con CMIs de 0,25-

1 mg/l pueden ser tanto sensibles como resistentes *in vivo* [73,74]. No obstante algunos autores han señalado que un número significativo de cepas de *Aspergillus* spp. y de *Rhizopus* spp. que muestran resistencia *in vivo* tienen una CMI de anfotericina B ≥ 2 mg/l [7,75].

Para intentar superar la falta de correlación, en los últimos años se han empezado a valorar parámetros farmacocinéticos con la intención de encontrar un método más adecuado para integrar la respuesta al tratamiento y las pruebas de sensibilidad. Estos estudios se basan en las relaciones farmacodinámicas como el cociente entre las concentraciones plasmáticas o el área bajo la curva (AUC) y la CMI, o el tiempo que se mantiene la concentración del antifúngico por encima de la CMI. De esta forma, para la anfotericina B se ha observado que la respuesta al tratamiento es significativamente superior cuando el cociente entre la concentración plasmática máxima y la CMI es ≥ 2 [76]. Por tanto, si con las dosis que se utilizan actualmente se alcanzan concentraciones plasmáticas de 1-2 mg/l, las cepas con CMI de 0,5-1 mg/l podrían considerarse como resistentes. Pero este planteamiento puede cambiar, si se tiene en cuenta que con las formulaciones lipídicas de la anfotericina B pueden administrarse dosis más elevadas, con las que se alcanzan concentraciones plasmáticas o tisulares más altas [1].

Las relaciones farmacodinámicas también se están empezando a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de correlación con los azoles. Para el itraconazol y otros triazoles apenas existen datos relevantes [64], pero en el caso del fluconazol, algunos expertos creen que el cociente AUC/CMI puede ser la mejor forma de predecir la respuesta al tratamiento con fluconazol. De esta forma, un cociente >25 se relaciona con índices de respuesta superiores al 90%; con un cociente <25 , los índices de respuesta descienden al 70%; y por último, con un cociente $<6,5$, la probabilidad de respuesta se reduce al 57% [8].

Utilidad actual de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

En términos generales, las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos ofrecen información para instaurar los tratamientos más adecuados. Así, en función de los datos recopilados en el tiempo, se puede saber cual es el tratamiento inicial más correcto para una determinada infección. Asimismo puede saberse si es necesario cambiar el tratamiento cuando se identifica la especie causante de la infección y además, puede cambiarse el tratamiento en función del estudio de sensibilidad e instaurar una terapia específica.

En el ámbito de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos existen algunas evidencias fiables para recomendar terapias o para hacer cambios de tratamientos. Así por ejemplo, estudios epidemiológicos realizados en España han demostrado que el 95% de las candidemias se producen por especies sensibles *in vitro* al fluconazol, por lo que es correcto decir que el fluconazol puede emplearse como tratamiento inicial de estas micosis [77,78]. En segundo término, si en un caso de candidemia en tratamiento con fluconazol se identifica la cepa causante como *C. krusei*, una especie intrínsecamente resistente a este antifúngico, debe recomendarse un cambio de tratamiento. Por último, si la cepa causante es *C. albicans* y al realizar un estudio de sensibilidad la CMI de fluconazol es 64 mg/l, puede aconsejarse un cambio de terapia, aunque no haya una buena correlación *in vitro-in vivo* en las micosis profundas, como ya se indicó en el apartado anterior.

Por tanto las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos tienen utilidad clínica, aunque en el caso de las micosis profundas, en las que los enfermos suelen estar inmunodeprimidos, en las que existen muchas dificultades para diagnosticar la infección y en las que el tratamiento antifúngico es poco eficaz, esta utilidad se diluye y sólo constituye un factor más a tener en cuenta a la hora de enfocar el manejo del enfermo.

Debe destacarse que las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos pueden tener una mayor utilidad en determinados casos, como por ejemplo en cepas procedentes de enfermos en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en cepas de enfermos que han recibido profilaxis antifúngica previa y en cepas pertenecientes a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su espectro de sensibilidad *in vitro* [34-36]. En estos casos, el estudio de sensibilidad puede ayudar a elegir la mejor alternativa farmacológica y ofrecer información para aumentar la dosis o incluso empezar una terapia combinada. Por otra parte, la vigilancia epidemiológica tiene un papel notable, ya que gracias a ella puede conocerse el perfil de sensibilidad de las distintas especies, su incidencia y establecer

cuáles son los tratamientos iniciales más adecuados [79]. Por ello deben realizarse estudios epidemiológicos periódicos para determinar la sensibilidad de las especies implicadas en las diferentes infecciones.

Como conclusión nos gustaría indicar, que si se decide hacer estudios de sensibilidad a los antifúngicos, estos deberían efectuarse en instituciones sanitarias que los realicen rutinariamente, con un control de calidad estricto y siguiendo una metodología estandarizada (NCCLS, NCCLS-like o EUCAST). Los estudios de sensibilidad con métodos comerciales pueden ser una alternativa para algunos laboratorios asistenciales, ya que detectan la resistencia a los azoles con bastante fiabilidad. No obstante si se decide utilizar un método comercial, debería emplearse técnicas con las que se han realizado estudios demostrando una alta reproducibilidad y que tienen una buena correlación con los métodos de referencia (Etest, Sensititre y ASTY). Además sería aconsejable que se realizaran estudios comparativos para evaluar la correlación que existe entre el método comercial y los estándares, en manos de cada laboratorio en particular.

Bibliografía

- Ellis M. Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. *Mol Immunol* 2002; 38:947-957.
- Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (Suppl 2):S112-S118.
- Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999; 1:247-261.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:382-402.
- Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Mechanisms of fungal resistance: an overview. *Drugs* 2002; 62:1025-1040.
- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:73-85.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 2):46-53.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:643-658.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Vilanova, USA, 1997.
- Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1648-1654.
- Schmalreck AF, Fegeler W. Criteria for a microdilution susceptibility testing method of fluconazole: proposal of a standardized testing method for yeasts. *Mycoses* 1996; 39 (Suppl 2):12-16.
- Schmalreck AF. Susceptibility testing of fluconazole: evaluation of a multicenter study of the working group "Clinical Mycology" of the German Speaking Mycological Society. *Mycoses* 1996; 39 (Suppl 2):1-11.
- Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002, Taufkirchen, Germany.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, USA, 1998.
- Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3457-3459.
- Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* 2000; 41:203-220.
- Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1094-1097.
- Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on the growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39:525-532.
- Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2513-2517.
- Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Rodríguez-Tudela JL. Comparative evaluation of two standardized methodologies (NCCLS and EUCAST) for antifungal susceptibility testing. Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract J-570; Washington, D.C. American Society for Microbiology, 2001.
- Ghannoum MA, Ibrahim AS, Fu Y, Shafiq MC, Edwards JE, Jr., Criddle RS. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdilution technique. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2881-2886.
- Odds FC, De Backer T, Dams G, Vranckx L, Woestenborghs F. Oxygen as limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:995-997.
- Rodríguez Tudela JL, Martín-Díez F, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:400-404.
- Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1383-1386.
- Odds FC, Vranckx L, Woestenborghs F. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2051-2060.
- Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:153-156.
- Tornatore MA, Noskin GA, Hacek DM, Obias AA, Peterson LR. Effects of incubation time and buffer concentration on *in vitro* activities of antifungal agents against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1473-1476.
- Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2070-2074.
- Rex JH, Cooper CR, Jr., Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:906-909.

30. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1289-1290.
31. Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2817-2822.
32. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998; 177:425-430.
33. Arikan S, Hascelik G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:107-111.
34. Berenguer J, Rodriguez-Tudela JL, Richard C, et al. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Scedosporium prolificans* Spanish Study Group. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:256-265.
35. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:462-478.
36. Krčmery V, Krupova I, Denning DW. Invasive yeast infections other than *Candida* spp. in acute leukaemia. *J Hosp Infect* 1999; 41:181-194.
37. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, et al. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1828-1835.
38. Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, et al. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:163-177.
39. Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2760-2762.
40. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1360-1367.
41. Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1991; 29:393-394.
42. Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1345-1347.
43. Pujol I, Fernandez-Ballart J, Guarro J. Effect of inoculum form on in vitro antifungal susceptibilities of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:715-718.
44. Meletiadiis J, Meis JF, Mouton JW, Verweij PE. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J Clin Microbiol* 2001; 39:478-484.
45. Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly JP, Verweij PE. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3402-3408.
46. Vandebossche I, Vanechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth microdilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40:918-921.
47. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, et al. Multicenter comparison of the sensitive YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:591-595.
48. To WK, Fothergill AW, Rinaldi MG. Comparative evaluation of microdilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2660-2664.
49. Arthington-Skaggs BA, Motley M, Warnock DW, Morrison CJ. Comparative evaluation of PASCO and national committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2254-2260.
50. Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:336-342.
51. Martin-Mazuélos E, Gutierrez MJ, Aller AI, et al. A comparative evaluation of Etest and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:477-481.
52. Pfaller MA, Messer SA, Bolmstrom A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32:223-227.
53. Szekeley A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1480-1483.
54. Barry AL, Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2154-2157.
55. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Global Antifungal Surveillance Group. Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:215-223.
56. Sandven P. Detection of fluconazole-resistant *Candida* strains by a disc diffusion screening test. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3856-3859.
57. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:781-803.
58. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310-350.
59. Rex JH, Walsh TJ, Nettleman M, et al. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2001; 33:95-106.
60. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997; 24:235-247.
61. Dannaoui E, Colin S, Pichot J, Piens MA. Evaluation of the E test for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:228-232.
62. Laguna F, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV, et al. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1997; 24:124-130.
63. Querada C, Polanco AM, Giner C, et al. Correlation between in vitro resistance to fluconazole and clinical outcome of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:30-37.
64. Law D, Moore CB, Denning DW. Discrepancies associated with the measurement of itraconazole serum concentrations by bioassays. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:577-578.
65. Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:129-134.
66. Lee SC, Fung CP, Huang JS, et al. Clinical correlates of antifungal macrodilution susceptibility test results for non-AIDS patients with severe *Candida* infections treated with fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2715-2718.
67. Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, Nelson PW, Webb CD. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:40-44.
68. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1364-1368.
69. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:401-414.
70. Anaissie EJ, Karyotakis NC, Hachem R, Dignani MC, Rex JH, Paetznick V. Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. *J Infect Dis* 1994; 170:384-389.
71. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* 2001; 39:339-342.
72. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:497-502.
73. Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, et al. Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:85-93.
74. Verweij PE, Oakley KL, Morrissey J, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of LY303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:873-878.
75. Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:282-288.
76. Andes D, Stamsted T, Conklin R. Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:922-926.
77. Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:981-987.
78. Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. A multicenter study on fungemia caused by yeasts in Spain (April-June, 1997). A Work Group to Study Fungemia. *Rev Clin Esp* 1999; 199:356-361.
79. Ellis D, Marriott D, Hajeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 2000; 38 Suppl 1:173-182.