

Ponencias

Antifungal drug resistance

Emilia Mellado

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología. ISCIII, Madrid, España

The incidence of fungal infection has increased in the last ten years. Also, the characteristics of the invasive infection are changing with the isolation of new species, most of them showing resistance to antifungal drugs. The vast majority of infections by filamentous fungi are due to *Aspergillus fumigatus*, although other species such as *A. flavus*, *A. terreus*, *Fusarium* spp., and zygomycetes are also frequent pathogens.

Aspergillus species are the most common causes of invasive mold infections in immunocompromised patients. Invasive aspergillosis (IA) is normally not easy to diagnose and treat, resulting in a high mortality rate. Resistance to antifungal drugs is a recognized problem that occurs at a low frequency, but with an increasing rate in some countries. In *A. fumigatus* resistance is largely confined to azole class drugs, as resistance to polyenes or echinocandins drugs is uncommon. However, as the number of patients with disease or chemically-induced immune deficiencies increases, resistance among clinical strains may become more abundant, especially with the expanded use of second-generation triazole drugs for prophylaxis and empirical therapy.

Drug resistance detection. The introduction of new antifungal agents, and recent reports of resistance emerging during treatment of *Aspergillus* infections, have highlighted the need for standardized methods of antifungal drug susceptibility testing for filamentous fungi. In the last years, considerable efforts focused in developing mould antifungal susceptibility testing (AST) have led to its standardization in Europe (EUCAST) as well as in the United States (CLSI). The availability of *A. fumigatus* azole resistant strains with known resistance mechanisms have been used to define wild-type populations, epidemiological cutoffs, and cross-resistance between azole drugs. Epidemiological cutoff for the wild-type populations of *A. fumigatus* has been established in ≤ 1 mg/L for itraconazole or voriconazole and ≤ 0.25 mg/L for posaconazole. Interpretative breakpoints for azole drugs have been defined for *Candida* spp. However, interpretation of filamentous fungi antifungal MICs is a more controversial issue. Nevertheless, tentative breakpoints have recently been proposed: for itraconazole and voriconazole ≤ 2 mg/L (susceptible), 2 mg/L (intermediate) and ≥ 2 mg/L (resistant) and for posaconazole ≤ 0.25 mg/L, 0.5 mg/L and ≥ 0.5 mg/L respectively.

Drug resistance mechanisms. The study of the antifungal drug resistance mechanisms at the molecular level is important for a better understanding of the nature of resistance, and to develop clinical and pharmacological strategies to avoid resistance in the future. To date, amphotericin B, azoles and echinocandins are licensed for IA treatment although triazoles seem to be key drugs in its therapy. The fungistatic nature of azole drugs have raised a considerable concern in relation to secondary resistance development. *Aspergillus fumigatus* azole resistance was first detected in 1997 and the underlying

molecular mechanisms of resistance have been thoroughly studied and characterized. Cross-resistance between azole drugs depends on specific mutations in Cyp51A, the azole target. Thus, a substitution of glycine in position 54 of Cyp51A confers cross-resistance to itraconazole and posaconazole. However, a substitution of methionine at position 220 or a duplication in tandem of a 34-bp fragment in the cyp51A promoter combined with a substitution of leucine at position 98 for histidine confers cross-resistance to all azole drugs tested.

Resistance surveillance. Although *A. fumigatus* azole resistance detection started as a trivial problem, recent reports are worrisome with increasing percentages of resistant strains going up to 5 to 12 % on different countries in Europe. Moreover, invasive aspergillosis due to multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* has emerged with some evidence that the resistance has primarily developed in our environment rather than in azole treated patients. The use of azole drugs in the field could have created an environmental reservoir where resistance appeared in plant pathogenic moulds but also in opportunistic fungi that inhabit the same environment. Also, the change in management of invasive aspergillosis, with a prominent role of triazoles in primary therapy and prophylaxis, might have contributed to the manifestation of this problem. Therefore, epidemiological surveillance is necessary to detect trends in *A. fumigatus* azole resistance and to anticipate resistance emergence against new antifungal drugs in clinical use.

IFI de brecha: ¿resistencia adquirida, resistencia clínica o sobreinfección?

Isabel Ruiz Camps

Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, España

Desde el principio de la década de 1990, se ha observado un incremento en la frecuencia de infecciones fúngicas invasoras (IFI). Las alteraciones en las defensas del huésped que favorecen la presencia de estas infecciones son muy variadas, aunque en términos generales pueden destacarse tres tipos: la neutropenia, el déficit en la función fagocítica y las alteraciones en la inmunidad celular. Por otra parte, las IFI constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes de riesgo y es por ello que desde la década de 1980 se han ideado estrategias de profilaxis, tratamiento empírico y dirigido con los antifúngicos que han ido apareciendo con el fin de mejorar el pronóstico de dichas infecciones.

En el contexto de estos tratamientos o profilaxis antifúngicas se han detectado fungemias de brecha, que pueden obedecer, en primer lugar, a la aparición de hongos resistentes, ya sea de forma intrínseca o adquirida al antifúngico utilizado, pudiendo estar relacionado este último mecanismo con niveles plasmáticos bajos del fármaco. En segundo lugar, el uso de antifúngicos junto con una mayor supervivencia de los pacientes ha condicionado cambios en la epidemiología de las especies que originan infecciones que antes eran consideradas como emergentes.

Infecciones fúngicas transmitidas por animales

F. Javier Cabañes

Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Se conoce un número reducido de micosis (ciertas dermatofitosis y esporotricosis), en las que exista transmisión directa entre los animales y los humanos. Los animales son el reservorio de las especies de dermatofitos consideradas zoófilas, presentando sus infecciones una considerable importancia entre las zoonosis. Tan solo unas pocas especies pertenecientes a los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* producen normalmente dermatofitosis en estos animales. Entre las más frecuentes que afectan a los animales domésticos destaca principalmente *Microsporum canis*, seguida de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (actualmente cepas zoófilas de *Trichophyton interdigitale* y *Trichophyton anamorfo* de *Arthroderma benhamiae*) y *Trichophyton verrucosum*. Algunas especies animales exóticas, como las iguanas o los erizos de tierra, están adquiriendo cierta popularidad como mascotas. Estos animales pueden ser portadores y transmisores de nuevos agentes zoonóticos. Entre los erizos de tierra las especies más comunes utilizadas como mascotas son el erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*) y el erizo europeo (*Erinaceus europaeus*). En ambos casos, la micosis más frecuente es la dermatofitosis producida por *Trichophyton erinacei*. En los últimos años se ha observado un incremento en los casos de zoonosis por esta especie en distintos lugares del mundo. La infección en estos animales puede ser asintomática incrementándose en este caso el riesgo de transmisión a las personas que los manipulan.

En el caso de la esporotricosis, el reservorio de *Sporothrix schenckii* (*sensu lato*) es el suelo y las plantas. No obstante, los gatos infectados pueden transmitir al hombre la enfermedad por mordeduras o arañazos. Se desconoce en la actualidad qué especies, dentro de este complejo filogenético, están implicadas en estas zoonosis. Estudios recientes realizados en el modelo murino, destacan como especie más virulenta a *Sporothrix brasiliensis*, seguida de *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*) y *Sporothrix globosa*. Por lo que respecta a las criptococosis, el definitivo nicho ambiental de *Cryptococcus neoformans* no ha sido aún determinado. No obstante una fuerte asociación ya histórica entre las excretas de aves, especialmente las de palomas, y las criptococosis causadas por esta especie está empezando a demostrarse por medio de técnicas moleculares. También se ha citado, en estudios realizados a propósito del brote de criptococosis humana aparecido en la isla de Vancouver (British Columbia, Canadá), que tanto gatos como perros con una infección asintomática o colonización nasal producida por *Cryptococcus gattii*, podían eliminar la levadura y, por lo tanto, ser posibles transmisores de esta especie al hombre.

Malassezia pachydermatis es una causa frecuente de otitis externa y distintas dermatitis en perros y gatos. El reservorio de esta levadura zoófila son principalmente ciertos carnívoros, especialmente los perros. Se han descrito brotes epidémicos en niños prematuros en los que la transmisión se produjo por el personal sanitario que presentaba colonización por esta levadura proveniente de sus perros. La gran mayoría de las micosis se engloban en el grupo de las sapronosis, en las que la fuente es un sustrato abiótico y la transmisión entre humanos es excepcional. La fuente de infección es a menudo el reservorio o el hábitat donde el agente etiológico de la enfermedad normalmente se desarrolla y multiplica. Así por ejemplo, en las adiaspiromicosis, coccidioidomicosis y las peniciliosis por *Penicillium marneffeii* el reservorio es el suelo. Sin embargo, se cree que algunos roedores y pequeños mamíferos podrían desempeñar un papel en la diseminación de los hongos causantes de estas micosis. En las candidiasis por *Candida albicans*, un caso característico de antroponosis en que la fuente es el hombre y la transmisión entre humanos es típica, se ha generado cierta controversia en este campo. Algunos autores indican que los animales deberían considerarse como fuentes potenciales de transmisión para los humanos, sobre todo en el caso de pacientes inmunodeprimidos. Otros, por el contrario, sugieren que existe una mayor probabili-

dad de transferencia de *C. albicans* del hombre a los animales que de los animales al hombre. No obstante se desconoce o existen pocos estudios sobre el papel de los animales en la transmisión de estas y otras muchas micosis y en el mantenimiento en la naturaleza de los hongos que son habitualmente agentes causales de estas enfermedades.

Microsporidiosis humana: presentación clínica, epidemiología y diagnóstico

Néstor Abreu Acosta

Dpto. Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, España

Los microsporidios son organismos eucariotas, unicelulares, de tamaño muy pequeño, parásitos intracelulares obligados y con capacidad para infectar a todos los grupos animales. Se conocen en la actualidad unos 144 géneros y 1200 especies, aunque sólo ocho géneros producen patologías humanas: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Pleistophora*, *Trachiplestiphora*, *Brachiola* y *Microsporidium*. La especie más frecuente en infecciones humanas es *Enterocytozoon bieneusi*, seguida de *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem*.

Estos microorganismos, aunque verdaderos eucariotas, poseen características moleculares y citológicas reminiscentes de procariontes. Estudios filogenéticos han demostrado que se corresponden con hongos altamente evolucionados, caracterizados por presentar un mecanismo de infección único en la naturaleza, con una tendencia a la reducción. Presentan dos tipos de organización celular: la fase de estado vegetativo, y la espora de resistencia. La fase vegetativa está constituida por la membrana, el citoplasma con ausencia de mitocondrias y el núcleo o núcleos. La espora o forma infectante, con un tamaño de 1 a 4 µm, presenta una pared con dos capas de naturaleza proteica, un esporoplasma con uno o dos núcleos, y las estructuras relacionadas con la infección (polaroplasto, filamento polar y vacuola posterior).

Las manifestaciones clínico-patológicas en el hombre se pueden englobar en formas localizadas y formas diseminadas. Dentro de las localizadas se encuentran la rino-sinusal, la pulmonar y la muscular (en inmunodeprimidos), las oculares y gastrointestinales, con diarreas autolimitadas (en inmunocompetentes) y las diarreas crónicas en inmunodeprimidos. En las formas diseminadas, principalmente en inmunodeprimidos, se ven afectados diversos órganos y tejidos, especialmente el respiratorio y el genitourinario. La gravedad de los síntomas clínicos depende del órgano infectado y el estatus inmunológico del hospedador; así, los pacientes con sida con recuentos de CD4 inferiores a 100/ml, son más susceptibles a las infecciones por *E. bieneusi* o *E. intestinalis*, desarrollando diarreas crónicas con posibilidad de fiebre, pérdida de apetito y peso, mientras que las infecciones de *E. bieneusi*, tienden a permanecer localizadas en el intestino delgado y el tracto biliar. Las infecciones diseminadas debidas a especies de *Encephalitozoon*, *Trachiplestiphora* y *Pleistophora* pueden asociarse a sinusitis, queratoconjuntivitis, hepatitis, miositis, peritonitis, nefritis, encefalitis y neumonía. Los pacientes trasplantados con terapia inmunosupresora se pueden ver afectados por infecciones de *E. bieneusi* y *Encephalitozoon* sp., desarrollando fatiga, fiebre, náuseas y diarreas. En el caso de *E. cuniculi* y *E. hellem*, se han descrito infecciones pulmonares, nasales, corneales, conjuntivales y del SNC.

Previamente a la pandemia del sida, la microsporidiosis se diagnosticaba raramente en humanos. Inicialmente, esta infección se asoció a pacientes inmunodeprimidos, en los cuales *E. bieneusi* estaba implicado en patologías intestinales y/o biliares en el 7-50% de los pacientes VIH-positivos. Estudios llevados a cabo en España en pacientes VIH-positivos con inmunosupresión severa y diarrea crónica, se detectaron estos patógenos oportunistas en el 31% de los adultos y en el 16% de los niños estudiados.

Actualmente los microsporidios se diagnostican cada vez más en individuos VIH-negativos, aunque con frecuencia con algún tipo de inmunosupresión. Otros grupos de riesgo son los ancianos, por su sistema inmunológico deficiente, y los niños, por sus hábitos higié-

nico-sanitarios, grupos entre los que en España se han identificado un 13% de los casos de diarrea por *E. bienesi*. En pacientes inmunocompetentes, estos patógenos inicialmente se detectaban en niños y adultos de zonas tropicales o con historial de viajes a ellas. Sin embargo, estudios serológicos han puesto de manifiesto la estrecha relación de los microsporidios con el hombre, al detectarse anticuerpos específicos frente a *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* y *Brachiola algerae* en individuos sanos. Estos datos sugieren que los microsporidios causantes de infecciones en el hombre son patógenos zoonóticos. *E. bienesi*, que era considerado exclusivo del hombre, se ha aislado en un número considerable de animales. El potencial zoonótico de *E. cuniculi* se conocía desde hace tiempo mientras que *E. hellem* se ha encontrado en aves.

En Canarias, se ha detectado únicamente *E. bienesi*. La prevalencia de la microsporidiosis intestinal por este hongo se encuentra entre el 7 y el 60%, valores descritos para pacientes con diarrea crónica y negativos para otros patógenos. Las infecciones pulmonares por *E. bienesi* se han documentado en pacientes VIH-positivos. Aunque no son frecuentes, sin embargo, en Canarias se han encontrado con una prevalencia del 16% en pacientes sin inmunodeficiencias y en ausencia de otros patógenos. Las infecciones urinarias producidas por *E. bienesi* son raras, teniéndose constancia de pocos casos y relacionados con el VIH. Por el contrario, en Canarias, se han detectado en la orina de pacientes sin alteraciones inmunológicas. Estos datos, junto con el hecho de que se han detectado en pacientes pertenecientes a todos los grupos de edad, justifican la importancia que están adqui-

riendo estos hongos como patógenos. Los microsporidios han pasado de producir infecciones oportunistas asociadas a inmunodeficiencias, a ser capaces de infectar a cualquier tipo de persona.

Su pequeño tamaño y los métodos de diagnóstico de difícil acceso han desempeñado un importante papel en el reconocimiento de estas infecciones. El diagnóstico de la microsporidiosis humana se basa en la identificación de esporas en muestras clínicas, en biopsias o muestras tisulares. La técnica de elección es la tinción de tricrómico modificado descrita por Weber, de la que se han descrito algunas modificaciones. Otra posibilidad son los colorantes quimioluminiscentes, que otorgan gran rapidez y sensibilidad. Para la diferenciación específica; sin embargo, es necesaria la utilización de técnicas de biología molecular o de inmunofluorescencia, sin comercializar actualmente. El desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, más sensibles y específicas, puede estar relacionado con el aumento del número de casos diagnosticados.

Las fuentes de infección de las microsporidiosis humanas se conocen parcialmente. Entre ellas se encuentran los animales domésticos y silvestres, pacientes infectados, así como las aguas superficiales. Por tanto, las vías de transmisión pueden ser las rutas oral, respiratoria, ocular y sexual. A las personas de riesgo para desarrollar microsporidiosis, se les debe instar a beber agua embotellada o hervida, lavarse las manos apropiadamente, así como evitar el contacto con personas o animales infectados. Otras estrategias preventivas incluyen el cocinado de carne, pescado y mariscos, así como el lavado de frutas y vegetales antes de la ingestión.