

Comunicaciones científicas

Evolución de la infección sistémica por *S. schenckii* y *S. brasiliensis* en modelo murino

Fabiola Fernández¹, Javier Capilla², Emilio Mayayo¹ y Josep Guarro²

¹Unidad de Anatomía Patológica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

²Unidad de Microbiología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Antecedentes. La esporotricosis es una enfermedad causada por el hongo dimorfo *Sporothrix*, que frecuentemente cursa con afectación linfocutánea, aunque en ocasiones puede diseminarse y afectar diferentes órganos internos. Diferentes estudios han intentado relacionar características fenotípicas de las cepas patógenas con la gravedad de las infecciones sin observarse un patrón característico específico. Recientemente nuestro equipo determinó que la única especie considerada patógena para el hombre (*Sporothrix schenckii*) es en realidad un complejo de especies, en el que *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*) son las más frecuentemente aisladas en clínica.

Objetivo. Comparar en un modelo murino de infección diseminada la virulencia y progresión de la infección causada por *S. schenckii* (Ss) y *S. brasiliensis* (Sb).

Método. Se establecieron dos grupos de animales (n=20 animales/grupo) infectados por vía intravenosa, con 2x10⁷ conidios/animal (Ss) y (Sb). Cuatro ratones por grupo fueron sacrificados a los 2, 4, 6, 10 y 15 días después de la infección. Hígado, bazo y riñón fueron removidos asépticamente, para determinar la carga fúngica y realizar estudios histopatológicos.

Resultados. Los órganos pertenecientes a los animales infectados con Sb presentaron una elevada carga fúngica en todos los órganos que fue incrementándose a medida que progresaba el tiempo de infección. En el caso de la infección por Ss la carga fúngica por gramo de tejido fue menor que en la infección por Sb y dicha carga se mantuvo o disminuyó durante el período experimental. El estudio histopatológico reveló que la infección por Ss da lugar a una respuesta inflamatoria granulomatosa, mientras que en Sb hay una escasa respuesta inflamatoria y una elevada invasión de células fúngicas en todos los tejidos estudiados, especialmente hígado.

Conclusiones. La infección sistémica producida por *S. brasiliensis* es más virulenta que la causada por *S. schenckii*, presentando una mayor capacidad invasora del tejido, y una elevada carga fúngica.

Caracterización de aislamientos clínicos atípicos de *Candida dubliniensis*

Olatz Albaina¹, Marisa Brusca², Alcira Rosa², Jonathan Cabezas¹, María Dolores Moragues¹ y José Pontón¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Antecedentes. Para la identificación de *C. dubliniensis* se utilizan tanto pruebas fenotípicas como genotípicas, siendo estas últimas las más precisas. Se han identificado seis aislamientos clínicos

de *C. dubliniensis* que muestran un comportamiento atípico en medios cromógenos, formando colonias rosas en medio CHROMagar (CHROMagar, París, Francia), mientras que en el medio Candida ID2 (bioMérieux, Francia) las colonias son blancas.

Objetivo. Caracterizar seis aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* mediante métodos fenotípicos, genotípicos e inmunológicos.

Materiales y Métodos. Se estudiaron seis aislamientos clínicos atípicos de *C. dubliniensis*, así como la cepa de referencia NCPF 3949. Los aislamientos fueron identificados por asimilación de fuentes de carbono mediante galerías ID 32 C (bioMérieux). Para la identificación genotípica se emplearon iniciadores específicos de *C. dubliniensis* que codifican para la topoisomerasa II: CDBF28F y CDBR110R (CDBF28F: 5'-AAA TGG GTT TGG TGC CAA ATT A-3'; CDBR110R: 5'-GTT GGC ATT GGC AAT AGC TCT A-3'; Genotek-Bonsai España), y los productos de PCR fueron secuenciados (Unidad de Genómica de la Universidad del País Vasco). La distribución de genotipos entre los seis aislamientos se realizó mediante iniciadores específicos que amplifican secuencias nucleotídicas de las regiones ITS1 e ITS2 que flanquean el gen 5,8 S ARNr, empleando cuatro parejas de iniciadores: G1F/G1R, G2F/G2R, G3F/G3R y G4F/G4R (Gee et al., J. Clin. Microbiol. 2002, 40:556-574). La producción de clamidosporas se estudió en agar Staib, agar caseína y agar CHROM-Pal, tras incubación hasta 72 horas a 30 °C. La identificación también se comprobó mediante aglutinación de partículas de látex Bichro-Dubli® (Fumouze Diagnostico, Levallois-Perret, Francia), así como por su reactividad por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un antisuero específico. La susceptibilidad a los antifúngicos se determinó en placas Sensititre YeastOne 8 (Trek Diagnostico Sistema).

Resultados. Los aislamientos fueron identificados como *C. dubliniensis* mediante los métodos empleados (tabla). Las seis cepas pertenecían al genotipo 2 y mostraron sensibilidad in vitro frente a los antifúngicos ensayados. La única diferencia mostrada respecto a las cepas de referencia de *C. dubliniensis* es el color de las colonias desarrolladas en los medios cromógenos CHROMagar Candida y Candida ID2, lo que podría conducir a una identificación errónea si sólo se utilizan estos medios para el aislamiento e identificación.

Conclusión. La identificación de *C. dubliniensis* debería realizarse mediante la combinación de técnicas fenotípicas y genotípicas.

Agradecimientos. Trabajo subvencionado por los proyectos IT-264-07 del Departamento de Educación, Universidades e Investigación, y SAIO TEK (S-P08BUN10) del Departamento de Industria, Comercio y Turismo, del Gobierno Vasco.

Actividad in vitro del tiabendazol frente a *Penicillium expansum*: comparación del método CLSI M38-A con técnicas tradicionales

Lorena Alborch, Romualdo Cabañas, M. Lourdes Abarca, M. Rosa Bragulat y F. Javier Cabañas

Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

Antecedentes. Los métodos clásicos para determinar la resistencia in vitro de los hongos fitopatógenos a los fungicidas consisten en

la siembra de las cepas en medios suplementados con distintas concentraciones del antifúngico en estudio y la posterior determinación de la inhibición de la germinación de los conidios y la reducción del diámetro de la colonia.

Objetivos. Debido a la falta de un método estandarizado, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar si el método CLSI M38-A, ampliamente utilizado en los laboratorios de micología clínica, podía ser adecuado para conocer la sensibilidad al tiabendazol (TBZ) de *Penicillium expansum* en comparación con otras técnicas.

Métodos. Se estudiaron un total de 128 cepas de *P. expansum*. En todos los métodos evaluados, el tamaño del inóculo se ajustó a 106 conidios/ml. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en un estudio preliminar, el rango de concentraciones finales de TBZ ensayadas fue de 0,03 a 16 µg/ml, o bien de 8 a 512 µg/ml. Se determinaron los valores de CMI (CMI50 y CMI90) mediante el método CLSI M38-A, modificando la temperatura y tiempo de incubación (25 °C y 72 h respectivamente) y mediante el método de dilución en agar (25 °C, 48 y 72h). Para cada una de las cepas y concentraciones de TBZ ensayadas se determinó el diámetro de la colonia a las 48 y 72h de incubación a 25 °C y se calculó su porcentaje de reducción en comparación con el diámetro de la cepa en el medio base sin antifúngico, así como la EC50 (concentración efectiva que produciría el 50% de inhibición de la colonia). El porcentaje de inhibición de la germinación para cada cepa y concentración de TBZ se calculó a las 24h de incubación.

Resultados. Un total de 46 cepas (35,9%) presentaron una CMI de 0,25-0,5 µg/ml utilizando tanto el método de microdilución M38-A como el de dilución en agar, por lo que el porcentaje de concordancia entre ambos métodos fue del 100%. Para estas cepas, los valores medios de EC50 oscilaron entre 0,22 y 0,23 µg/ml. Las 82 cepas restantes (64,1%) se consideraron resistentes al TBZ, con valores de CMI para ambos métodos superiores a 512 µg/ml, concentración máxima ensayada. El TBZ demostró un escaso efecto sobre la germinación de los conidios, ya que no se observó inhibición completa a la máxima concentración ensayada.

Conclusiones. Nuestros resultados demuestran que la adaptación realizada del método M38-A puede ser una buena alternativa para valorar la actividad *in vitro* de *P. expansum* al tiabendazol.

Diversidad filogenética molecular del hongo mucoral emergente *Apophysomyces*: propuesta de tres nuevas especies

Eduardo Alvarez¹, Alberto M. Stchigel¹, Josep Cano¹, Deanna A. Sutton², A.W. Fothergill², Jagdish Chander³, Valentina Salas¹, M.G. Rinaldi² y Josep Guarro¹

¹Mycology Unit, Medical School and IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

²Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EE.UU.

³Government Medical College & Hospital, Chandigarh, India

Antecedentes. *Apophysomyces* (Misra) es un género monoespecífico perteneciente al Orden Mucorales, capaz de producir infecciones en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes. En un estudio previo, demostramos la elevada variabilidad de las secuencias de la región 5.8 S del ADNr en un grupo de aislamientos clínicos identificados como *Apophysomyces elegans*.

Objetivos. Identificar posibles nuevas especies del género *Apophysomyces*.

Métodos. Mediante un estudio polifásico de un grupo de aislamientos clínicos y ambientales de esta especie que incluyó el análisis de las secuencias de la región ITS, un fragmento del gen de la histona 3 y los dominios D1 y D2 del 28S del ADNr, así como la evaluación de diferentes caracteres morfológicos y fisiológicos, se demuestra que *Apophysomyces elegans* es un complejo de especies.

Resultados. Se proponen las especies *Apophysomyces ossiformis*, caracterizada por su lenta esporulación y sus esporangiosporas con forma de hueso; *Apophysomyces trapeziformis*, con esporangiosporas

trapezoidales, y *Apophysomyces variabilis*, con esporangiosporas de formas diversas, como nuevas especies para la Ciencia. Dichas especies no asimilan la esculina, en tanto que *Apophysomyces elegans* fue capaz de asimilar dicho glicósido.

Conclusiones. *Apophysomyces* es un complejo de especies, observándose que *A. elegans* no estaría relacionada en casos clínicos, siendo aislada de muestras ambientales.

Eficacia del posaconazol en el tratamiento de la infección experimental por *Fonsecaea monophora* en el ratón neutropénico

Enrique Calvo, F. Javier Pastor, M. Mar Rodríguez y Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Antecedentes. *Fonsecaea monophora* es un hongo dematiaceo descrito como agente causal de feohifomicosis y cromoblastomicosis. Esta especie ha sido recientemente segregada de *Fonsecaea pedrosoi*, con la que presenta diferencias en el tipo de infecciones que provoca: *F. pedrosoi* es una especie mayoritariamente asociada a casos de cromoblastomicosis, mientras que *F. monophora* produce una mayor variedad de cuadros clínicos, mostrando en algunos casos cierto neurotropismo. El itraconazol (ITZ) y la anfotericina B (AMB) son dos antifúngicos utilizados con éxito en el tratamiento de las infecciones causadas por *F. monophora*. Sin embargo, el uso de la AMB se ve limitado por su toxicidad y la larga duración del tratamiento que requieren este tipo de infecciones. Por otra parte, se han identificado cepas de *F. pedrosoi* resistentes al itraconazol, lo que unido a problemas relacionados con la administración de este antifúngico y sus efectos secundarios (variable absorción gastrointestinal y alteraciones en la conductividad cardíaca), justifican la búsqueda de alternativas terapéuticas.

Objetivos. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de infección diseminada producida por *F. monophora* en ratones inmunocomprometidos para evaluar y comparar la eficacia de la AMB, el ITZ y el posaconazol (PSC).

Métodos. Se utilizaron dos aislamientos clínicos de *Fonsecaea monophora* (CBS 269.37 y CBS 117236), sensibles *in vitro* a los antifúngicos ensayados. Se usaron ratones macho OF-1 que fueron inmunosuprimidos el día anterior a la infección mediante una única administración intraperitoneal (i.p.) de ciclofosfamida 200 mg/kg y 5-fluorouracilo 150 mg/kg por vía intravenosa. Los ratones fueron infectados con 2x10⁵ ufc de la cepa CBS 117236 ó 1x10⁶ ufc de la cepa CBS 269.37. Los tratamientos ensayados fueron: AMB a 1,5 mg/kg i.p. y PSC a 10, 20 ó 40 mg/kg oral Q.D., e ITZ a 25 mg/kg oral b.i.d. Los tratamientos comenzaron un día después de la infección y se prolongaron durante 7 días. La eficacia de los tratamientos se evaluó mediante la prolongación de la supervivencia y la reducción de la carga fúngica en riñones, pulmones, bazo y cerebro. Mediante bioensayo se determinó el nivel de cada antifúngico en suero y cerebro de ratones infectados con la cepa CBS 269.37, tratados con los mismos fármacos y dosis que en los estudios de supervivencia y recuento fúngico. Los animales se sacrificaron el día 6 de tratamiento, 4 horas después de la última administración.

Resultados. Las dosis de PSC 20 y 40 mg/kg prolongaron significativamente la supervivencia respecto al grupo control y el resto de terapias. A su vez, este fármaco presentó una eficacia dosis-dependiente reduciendo la carga fúngica en los órganos. La administración de la AMB únicamente prolongó la supervivencia de los ratones infectados con la cepa CBS 269.37, mientras que la administración de ITZ no prolongó la supervivencia en ningún caso. La AMB y el ITZ mostraron una menor capacidad en reducir la carga fúngica en los órganos que el PSC. Los niveles de fármaco en suero y cerebro fueron superiores a las CMI correspondientes.

Conclusiones. Este estudio confirma el uso del PSC como una alternativa al ITZ en el tratamiento de las feohifomicosis.

Resistencia al tiabendazol y mutaciones en el gen de la β -tubulina en *Penicillium expansum*

Gemma Castellá, Romualdo Cabañas, M. Lourdes Abarca, M. Rosa Bragulat y F. Javier Cabañas

Grupo de Micología Veterinaria, Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales, UAB, Barcelona, España

Antecedentes. *Penicillium expansum* es el agente causal del moho azul en frutas. Su control se basa en la aplicación de antifúngicos benzimidazólicos, principalmente tiabendazol. Este compuesto se une a la β -tubulina e inhibe la polimerización de los microtúbulos. El uso de dicho antifúngico ha ocasionado la aparición de resistencias. La resistencia a los benzimidazoles ha sido asociada con mutaciones en el gen de la β -tubulina, que alteran la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión de los benzimidazoles.

Objetivos. El objetivo de este trabajo fue investigar la relación entre la resistencia al tiabendazol y las mutaciones en el gen de la β -tubulina en cepas de *P. expansum*.

Métodos. Se evaluó la sensibilidad de un total de 71 cepas de *P. expansum* frente al tiabendazol utilizando placas de PDA suplementadas con tiabendazol a una concentración final de 4 y 16 μ g/ml. Se amplificó una región del gen de la β -tubulina con los primers Bt-T2M-up y Bt-LEV-L01 de todas las cepas. Posteriormente se limpiaron los fragmentos y se secuenciaron con los primers Bt-LEV-up4 y Bt-LEV-L01, empleando el kit de secuenciación Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Clustal X.

Resultados. De las 71 cepas, 37 fueron sensibles al tiabendazol y 34 resistentes. La región de DNA secuenciado incluía 624 pares de bases. Se identificaron 10 genotipos diferentes con una similitud del 99,7-100% con la cepa tipo de *P. expansum* NRRL976. La mayoría de cepas (48) pertenecían al genotipo I, que incluía la cepa NRRL 976. Los genotipos II, IV, V, VI, VII, IX y X presentaron una base diferente respecto al genotipo I, mientras que los genotipos III y VIII presentaron dos bases diferentes. La secuencia de aminoácidos contenía 191 aminoácidos, del residuo 167 al 357 del gen de la β -tubulina. Los genotipos I, II, IV, V, VI y VII presentaron la misma secuencia de aminoácidos. El genotipo II presentó una mutación en el codón 285 (Asp/Ser), el genotipo VIII presentó mutaciones en el codón 198 (Glu/Val) y 240 (Leu/Phe), y los genotipos IX y X presentaron sólo mutaciones en el codón 198 (Glu/Val y Glu/Ala, respectivamente). Ninguna de las cepas sensibles al tiabendazol, excepto una, presentaron mutaciones en el fragmento secuenciado. De las 34 cepas resistentes, sólo 8 presentaron mutaciones que estaban localizadas en los codones 198 y 240. Todas las cepas con mutaciones en el codón 198 fueron resistentes. Sin embargo, un elevado porcentaje de cepas resistentes no presentaron ninguna mutación en el fragmento de la β -tubulina secuenciado.

Conclusiones. La mutación del codón 198 del gen de la β -tubulina se correlaciona con la resistencia al tiabendazol en cepas de *P. expansum*. Sin embargo, otros mecanismos deben estar implicados debido al elevado porcentaje de cepas resistentes que no presentaban ninguna mutación.

Three dimensional models of 14- α sterol demethylase (Cyp51A) from *Aspergillus lentulus* and *A. fumigatus*. An insight into differences in voriconazole interaction

I. Cuesta, A. Alastruey-Izquierdo, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and E. Mellado

Micology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid, Spain

Background. *Aspergillus fumigatus* is the main causative agent of invasive aspergillosis, normally affecting immunocompromised patients suffering severe hematological malignancies and transplant recipients. However, recent studies have demonstrated that some morphologically isolates identified as *A. fumigatus* might be different species belonging to the section *Fumigati*. *Aspergillus*

lentulus, one of this sibling species of *A. fumigatus*, is increasingly reported in clinical samples. Awareness appears as this species shows primary resistance to azole drugs. In *A. fumigatus*, the cytochrome P450 14- α sterol demethylase (Cyp51A) is responsible for the azole drugs affinity.

Aims. Since voriconazole is the first line treatment for invasive aspergillosis, a three dimensional model of Cyp51A from *A. fumigatus* and *A. lentulus* was used to explore differences in voriconazole interaction.

Methods. The overall structure of Cyp51A proteins in *A. fumigatus* and *A. lentulus* three-dimensional protein models were derived from the crystal structure (in complex with fluconazol) of *Mycobacterium tuberculosis* (PDB code: 1EA1) by homology modeling.

Results. EUCAST and E-test azole MICs values are different between *A. fumigatus* and *A. lentulus*. The overall structural similarity of 3D models of Cyp51A protein from *A. fumigatus* and *A. lentulus* was almost identical. However, some critical differences raise from the theoretical models of both systems, concerning the putative closed form adopted upon voriconazole binding. A closer insight into *A. fumigatus* and *A. lentulus* voriconazole putative binding site, reveals hypothetical contacts between the BC loop and voriconazole that could correlate with the different susceptibility to the inhibitor shown by these *Aspergillus* species.

Conclusions. In summary, the data presented here suggest that *A. lentulus* is less susceptible to voriconazole due to a decreased affinity for the azole target Cyp51A. The structural model of *Aspergillus* spp. Cyp51As described in this study can be used in azole drugs optimization, virtual screening, or de novo inhibitors synthesis to improve the treatment of infections produced by this intrinsically azole resistant species of fungi.

A propósito de un caso: mucormicosis rino-orbito-cerebral

M.S. Durán¹, M. Loring², A.M. Fernández¹, C. Mediavilla¹, Y. Fárez¹ y M.D. Arias³

¹Sección de Microbiología, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga, España

²Servicio de Medicina Interna, Hospital Comarcal de la Axarquía, Málaga, España

³Unidad de Cuidados Intensivos, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga, España

Caso clínico. Varón de 47 años DM II de 10 años de evolución en tratamiento con ADO y desde hace dos meses en tratamiento con corticoides por cuadro de lumbalgia, con mal control de glucemias. Una semana después presenta lesiones vesiculosas en labio superior, con diagnóstico de herpes labial, que son tratadas con famciclovir, sin observarse mejoría. Acude a urgencias por desviación de comisura labial hacia la izquierda, imposibilidad de cerrar ojo derecho y tumefacción de hemicara derecha. Valorado por ORL, se diagnostica paresia facial periférica derecha secundaria a VHS y se propone la continuación del tratamiento antiviral. Al mes acude a una revisión en Medicina Interna, presentando tumefacción y empastamiento de región malar derecha, por lo que es ingresado.

Pruebas complementarias. Hemograma: HB: 12,5; VCM: 84; leucocitos: 10.450 con 81% de neutrófilos; plaquetas: 440.000 y coagulación normal; VSG: 71. Bioquímica: glucosa: 140; creatinina: 0,7; GOT: 47; GPT: 77; FA: 117; GGT: 104. Un TAC de senos paranasales y órbita mostró engrosamiento mucoso del seno maxilar derecho con nivel hidroaéreo, afectación de las paredes del seno y soluciones de continuidad en la pared inferior orbitaria e infiltración del músculo recto inferior. Se punzó el seno maxilar para una toma de muestra para Microbiología y Anatomía Patológica.

Estudio microbiológico (exudado). No se evidenciaron hongos filamentosos a pesar de la alta sospecha de mucormicosis; cultivo positivo para anaeróbios.

Anatomía patológica (biopsia). Tejido necrótico con hifas gruesas no septadas e invasión intravascular, sugestivas de hongos del orden

Mucorales. Tras la colaboración conjunta con los patólogos, se decidió tomar una nueva muestra para completar el estudio. Al examen directo con KOH se observaron hifas gruesas irregulares no septadas, con ramificaciones de 90°. En el cultivo en medio de agar Sabouraud dextrosa sin cicloheximida a 37 °C, se apreció a las 48 h crecimiento fúngico: colonias elevadas algodonosas de color blanquecino, que posteriormente cambiaron a un color grisáceo oscuro. Tras la observación con azul de lactofenol, el aislamiento se identificó como *Rhizopus* spp.

Diagnóstico. Mucormicosis rino-orbita-cerebral por *Rhizopus* spp.

Discusión. Los zigomicetos son hongos ubicuos en la naturaleza. Las infecciones suelen producirse en individuos con factores de riesgo como diabetes mellitus, corticoterapia, acidosis metabólica, neoplasias hematológicas, trasplantados de órgano sólido, presencia de VIH, tratamiento con desferroxamina y quemaduras. A pesar del tratamiento agresivo (cirugía y anfotericina B liposomal), la mortalidad varía entre el 25% y el 50%, por lo que un diagnóstico precoz es esencial. El 90% de las mucormicosis en esta localización anatómica está causada por *Rhizopus oryzae*. El diagnóstico diferencial debe hacerse con la aspergilosis invasora.

Conclusiones. Ante la sospecha de mucormicosis, debe tomarse para estudio microbiológico una muestra de tejido lo antes posible, en general sin introducirla en medios de transporte especiales. La biopsia no se debe homogenizar, haciendo improntas para las tinciones antes del cultivo. Se debe priorizar una actuación urgente con examen en fresco (KOH + tinta Parker) y tinciones de Giemsa, PAS o argénticas, trabajando paralelamente con Anatomía Patológica. La ausencia de hifas no descarta una mucormicosis, especialmente si el cuadro clínico es altamente sospechoso.

Evolución. A los 2 años es ingresado para reconstrucción del seno maxilar y de la órbita.

Feohifomicosis cutánea por *Exophiala jeanselmei*

A.M. Fernández¹, E. Gómez², M.S. Durán¹, J.M. Hernández¹, A. Sanz³ y V. Crespo²

¹Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga, España

²Servicios de Dermatología, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga, España

³Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga, España

Antecedentes. Los dematiáceos son un grupo de hongos pigmentados que se encuentran en el medio ambiente. Su mecanismo habitual de contagio es la inoculación traumática en piel a través de material orgánico contaminado.

Caso clínico. Paciente varón, 83 años, diabético, que acudía a consulta por la aparición de una lesión dolorosa de tres meses de evolución en el pulpejo del primer dedo de la mano derecha. No refería traumatismo previo, ni presentaba síntomas sistémicos acompañantes. A la exploración se observó un nódulo de 1 cm de

diámetro, indurado en profundidad y ulcerocostroso en superficie. Presentaba lesiones satélites próximas y onicodistrofia total de la uña de dicho dedo.

Estudio histopatológico. Se observó hiperplasia pseudoepiteliomatosa de la epidermis, y en la dermis un infiltrado inflamatorio granulomatoso compuesto de histiocitos, eosinófilos y polimorfonucleares. Se observaron estructuras globulares pigmentadas de pared gruesa, dispersas entre las células inflamatorias, algunas dispuestas en forma de rosario. Estas estructuras se teñían con PAS, metenamina de plata y Masson-Fontana.

Estudio micológico. En el cultivo en agar glucosado de Sabouraud a 25 °C se apreciaron colonias de lento crecimiento, textura mucoide y color negro, tanto en el anverso como en el reverso. No hubo crecimiento a 40 °C. En el estudio microscópico con azul de lactofenol se observaron hifas tabicadas y pigmentadas, que se ramificaban formando conidias de color marrón, ovales y agrupadas al extremo de anérides terminadas en punta.

Diagnóstico. Feohifomicosis cutánea por *Exophiala jeanselmei*.

Tratamiento. Terbinafina oral 250 mg/día durante tres meses, resolviéndose completamente la lesión.

Discusión. *Exophiala* spp. constituye un agente etiológico bien establecido de feohifomicosis y cromoblastomicosis; excepcionalmente causa micetoma eumicótico. Las dos primeras representan extremos de un continuo, basados en la interacción dinámica entre el agente etiológico y el huésped. Clínicamente, la feohifomicosis causada por este hongo se puede presentar de forma heterogénea como una o más placas, nódulos o abscesos subcutáneos con lento desarrollo y de centro purulento. Se han descrito lesiones con un anillo hiperpigmentado en periferia. La presentación clínica más frecuente consiste en un pequeño nódulo que afecta a piel y/o tejido subcutáneo, localizado en una región anatómica fácilmente traumatizable, lo que obliga a descartar un granuloma a cuerpo extraño, pero a diferencia de éste mostrará un curso crónico y crecimiento lento y progresivo. Los pacientes afectados son usualmente adultos con enfermedades debilitantes o sometidos a terapias inmunosupresoras, aunque se han descrito en pacientes sanos, como en nuestro caso. El diagnóstico microbiológico puede ser difícil y requiere una interpretación experta, ya que este hongo habita en el suelo y puede interpretarse en el cultivo como un contaminante. Su tratamiento ha sido discutido, planteándose la cirugía o la combinación de antifúngicos sistémicos como opciones terapéuticas. Estudios in vitro sobre la susceptibilidad de *Exophiala* a varios agentes antifúngicos han demostrado que la terbinafina, el itraconazol y la anfotericina B son los más activos.

Conclusión. Presentamos un nuevo caso de esta infección poco frecuente y recordamos la importancia de la búsqueda de signos guía acompañantes, como la onicodistrofia en nuestro caso. Resaltamos la buena evolución con terbinafina en este paciente, insistiendo en la importancia del seguimiento dada la elevada frecuencia de recurrencias.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de caracterización de las cepas aisladas

Método	Cepas aisladas					
	08-020	08-019	08-018	08-017	08-016	08-015
ID32C	7342140015	7142140015	7342140015	7142140015	7342140015	7342140015
Clamidosporas en agar STAIB	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Clamidosporas en agar CASEINA	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Clamidosporas en CHROM-PAL	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
IFI con antisuero policlonal	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Bichro-Dubli®	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
PCR con cebadores específicos	816bp	816bp	816bp	816bp	816bp	816bp
Genotipo	2	2	2	2	2	2
Secuenciación	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Sensititre Y-08	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible

Comparación de la producción de biopelícula por aislamientos orales y hemáticos de *Candida albicans*

Cristina Marcos-Arias, Elena Eraso, Ilargi Miranda-Zapico y Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

Antecedentes. *Candida albicans* es una de las principales causas de las micosis superficiales e invasoras. La producción de biopelícula es un importante factor de virulencia en la candidiasis asociada a catéteres y prótesis.

Objetivos. Comparar la producción de biopelícula por aislamientos de *C. albicans* de sangre, mucosa oral y prótesis.

Métodos. Se estudió la producción de biopelícula de 151 aislamientos orales de *C. albicans* (51 de prótesis y 50 de mucosa oral) y 46 aislamientos hemáticos de *C. albicans*. Las biopelículas se desarrollaron en una microplaca de poliestireno de 100 pocillos después de una incubación de 24 y 48 h a 37 °C. La producción de biopelícula se calculó con un test metabólico de reducción de sales de tetrazolio (XTT). Se usaron las cepas *C. albicans* NCPF 3153 y *C. albicans* Ca2 (mutante hifa-deficiente) como cepas de referencia.

Resultados. Todos los aislamientos de *C. albicans* produjeron biopelícula con importantes diferencias según su origen. La producción de biopelícula se clasificó como 6+ y 5+ (alta producción), 4+ y 3+ (producción intermedia), y 2+ y 1+ (poca producción), de acuerdo a Tortorano y col. [J Antimicrob Chemother 2005; 56: 777-779]. El 48% de los aislamientos de mucosa oral y el 35,3% de los aislamientos de prótesis fueron altamente productores de biopelícula a las 24h. El 35,3% de los aislamientos de mucosa oral y el 52% de los aislamientos de prótesis fueron productores intermedios de biopelícula. Por el contrario, solamente el 2,2% de los aislamientos de sangre fueron altamente productores y el 47,8% de los aislamientos fueron productores intermedios. Los aislamientos orales de *C. albicans* fueron más productores de biopelícula que los de sangre de *C. albicans* ($p = 0,001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($p = 0,18$) cuando se comparó la producción de biopelícula de los aislamientos de prótesis y de mucosa, siendo más productores los aislamientos de la mucosa oral.

Conclusiones. La producción de biopelícula en *C. albicans* está fuertemente asociada al origen clínico de los aislamientos: los orales son mayores productores de biopelícula que los de sangre.

Financiación. Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), S-PE08UN35 (Saiotek 2008, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco) y PI061895/2006 (Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España).

Administración intratecal de AMB liposomal como tratamiento de la criptococosis meníngea experimental en ratones

A. Flávia Gazzoni¹, J. Capilla², E. Mayayo¹ y J. Guarro²

¹Unidad de Anatomía Patológica, Universitat Rovira i Virgili

²Unidad de Microbiología, Universitat Rovira i Virgili

Antecedentes. El diagnóstico y tratamiento durante las primeras fases de la criptococosis ha permitido mejorar el pronóstico de esta enfermedad, reduciendo sensiblemente la mortalidad asociada a dicha infección. Sin embargo, la criptococosis meníngea continúa causando una elevada mortalidad, especialmente en aquellos pacientes que se hallan en una fase avanzada de la enfermedad. El tratamiento estándar incluye la terapia prolongada con AMB i.v. en forma de desoxicolato o en sus presentaciones lipídicas que, en ocasiones, no resultan efectivas debido a su toxicidad o a las bajas concentraciones alcanzadas en el SNC, respectivamente. Por ello es necesario el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas que permitan obtener el éxito terapéutico en aquellos casos en los que el tratamiento estándar resulta ineficaz.

Objetivos. Desarrollar un modelo animal de criptococosis meníngea aguda causada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en ratones y probar la eficacia de la administración intratecal de anfotericina B liposomal (AMBL) sola o en combinación con voriconazol (VRC).

Metodología. La infección se realizó mediante inoculación intracraneal de 585 UFC a través de la fontanela en ratones machos CD-1 de 4 semanas de edad (30 g). El tratamiento consistió en AMBL (6 mg/kg) administrada por vía intratecal, una vez a la semana, VRC administrado intravenosamente (i.v.) (20 mg/kg/día) o la combinación de ambos. Los tratamientos se iniciaron a los 5 días postinfección y fueron administrados durante 20 días. La eficacia de los tratamientos fue evaluada mediante el estudio de la supervivencia de los animales, la carga fúngica en cerebro y el estudio histopatológico.

Resultados. Nuestro modelo animal reprodujo la afectación meníngea por *Cryptococcus* observada en pacientes graves. Los animales control presentaban una evidente presión intracraneal 6 días después de la infección y el 100% de ellos sucumbieron a los 15 días postinfección. El examen histopatológico reveló una evidente meningitis con poca o nula afectación del parénquima cerebral y abundantes células levaduriformes encapsuladas. La combinación de AMBL intratecal y VRC p.o. incrementó significativamente la supervivencia de los animales y redujo la carga fúngica en comparación al grupo control y a las monoterapias ($p=0,0287$, en todos los casos). Asimismo, los animales sometidos al tratamiento combinado no presentaron evidencias de meningitis y sólo se observaron escasos elementos fúngicos en el espacio subaracnoideo.

Conclusiones. La administración intratecal de AMBL en combinación con VRC puede ser una opción terapéutica frente a la meningitis criptocócica grave en estados avanzados.

Morfologías atípicas de *Cryptococcus* en secciones tisulares: presentación de diez casos

Alexandra Flávia Gazzoni¹, Flávio de Mattos Oliveira², Cecília Bittencourt Severo², Emily Ferreira Salles², Luiz Carlos Severo^{2,3,4}

¹Unidad de Anatomía Patológica, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

²Laboratorio de Micología, Hospital Santa Rita/Santa Casa-Complexo Hospitalar, Porto Alegre-RS, Brasil

³Unidad de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

⁴Investigador 1B CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil

Antecedentes. En muestras clínicas, usualmente las especies de *Cryptococcus* son identificadas como levaduras esféricas u ovales con un diámetro entre 4-20 µm rodeadas por una cápsula de mucopolisacárido. La morfología más usual es la de gemaciones simples o múltiples de base delgada. Además de este aspecto clásico, las especies de *Cryptococcus* pueden presentar formas inusuales que pueden dificultar el diagnóstico. Éstas incluyen pseudohifas, cadenas de gemaciones y cepas pobremente encapsuladas.

Objetivos. Destacar las morfologías inusuales de *Cryptococcus* en tejidos y discutir la importancia del uso de tinciones - tinción argéntica de Grocott (GMS), mucicarmín (MM) y Fontana-Masson (FM) - en el diagnóstico de la criptococosis.

Métodos. Se estudiaron 925 casos clínicos de infección criptocócica diagnosticados en el Laboratorio de Micología, Santa Casa/Complexo Hospitalar (Porto Alegre-RS), en el Sur de Brasil. El examen histopatológico para determinar la afectación orgánica fue realizado mediante las tinciones de HE, GMS, MM y FM.

Resultados. Se identificaron morfologías poco comunes de *Cryptococcus*, incluyendo estructuras de tubo germinal (un caso), pseudohifas (dos casos) y levaduras no encapsuladas (ocho casos).

Conclusiones. Es importante reconocer las morfologías de *Cryptococcus* atípicas ya que pueden dificultar el diagnóstico. La asociación de tinciones es útil para el diagnóstico de *Cryptococcus*, ya sea cuando se halla en su forma usual o bien cuando presenta morfologías atípicas.

Sensibilidad in vitro a antifúngicos de cepas de *Candida* aisladas en pacientes con enfermedad liquenoide oral

M.L. Gainza-Cirauqui, J. Cabezas-Olcoz, M.A. Echebarria-Goikouria, D. Cortés-Ramírez, J. Pontón-San Emeterio, J.M. Aguirre-Uriar y M.D. Moragues-Tosantos

Máster de Patología Oral, Servicio Clínica Odontológica, Unidad de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, y Departamento de Enfermería, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco / EHU, Leioa, Vizcaya

Antecedentes. La enfermedad liquenoide oral (ELO) es un proceso mucocutáneo crónico de base inmunológica que se presenta entre el 1% y el 2% de la población, principalmente en mujeres en la edad perimenopáusica. Presenta un patrón clínico característico de pápulas blanquecinas dispuestas en retículas, que es acompañado en muchos casos de lesiones atróficas y erosivo-ulceradas. Abarca las lesiones de liquen plano oral (LPO) y lesión liquenoide oral (LLO). Se estima que existe colonización de *Candida* en la superficie de más del 50% de estas lesiones. Se plantea el debate de su implicación o asociación con la modificación clínica de las lesiones y con un posible rol en la transformación maligna de las mismas. Clásicamente, las infecciones fúngicas orales han sido tratadas con antifúngicos poliénicos y azoles, cuya eficacia ha sido analizada con buenos resultados. Típicamente, se utilizan antifúngicos tópicos para estas infecciones superficiales, así como tratamiento profiláctico durante el tratamiento de las lesiones atróficas y erosivo-ulceradas. Los casos de infección grave o resistente a la terapia convencional son tratados con antifúngicos sistémicos.

Objetivo. Determinar la sensibilidad in vitro a antifúngicos en cepas de *Candida* aisladas en pacientes con enfermedad liquenoide oral.

Pacientes, material y métodos. Se estudiaron 50 pacientes diagnosticados con ELO (38 mujeres y 12 hombres, con una edad media de 57,6 años). Se les realizó un estudio clinicopatológico completo y se tomaron muestras orales sobre las lesiones liquenoides para su estudio microbiológico. Las cepas de levaduras fueron aisladas en medios cromógenos (CHROMagar *Candida*, EE.UU.) completando su identificación mediante pruebas bioquímicas (API ATB ID 32C®, API bioMérieux, Francia). Se realizaron pruebas de sensibilidad a cinco antifúngicos poliénicos y azoles (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) en placas Sensititre YeastOne® (Trek Diagnostic Systems), y pruebas de sensibilidad a dos antifúngicos tópicos (nistatina y miconazol) por microdilución según el método el método M27-A3 de CLSI.

Resultados. De los 50 pacientes estudiados, 42 (84,0%) fueron diagnosticados de liquen plano oral y ocho (16,0%) de lesión liquenoide oral. Se aislaron 24 cepas de *Candida* (91,7% *Candida albicans* y 8,3% no-*C. albicans*). Entre el 14% y el 19% de las cepas de *C. albicans* era resistente a azoles (fluconazol, voriconazol e itraconazol, >64 µg/ml, >4 µg/ml y >1 µg/ml respectivamente), mientras que las cepas de *Candida* no-*C. albicans* mostraron resistencia variable a los antifúngicos. Todas las cepas estudiadas presentaban sensibilidad a los antifúngicos poliénicos (anfotericina B y nistatina) así como al antifúngico tópico miconazol.

Conclusiones. Se reconoce un nivel significativo de disminución de la sensibilidad a los azoles en los aislamientos de *Candida* de pacientes con enfermedad liquenoide oral. Los antifúngicos nistatina, anfotericina B y miconazol se muestran activos in vitro frente a las cepas aisladas de pacientes con ELO.

Detección de la resistencia a azoles en aislamientos de *C. neoformans* mediante dos sistemas comerciales en comparación con el método de microdilución del CLSI M27-A3

M.T. González, A.I. Aller, C. Castro, R. Claro, A. Romero, A. González y E. Martín-Mazuelos

U.G.C. Microbiología, Hospital de Valme, Sevilla, España

Objetivos. Comparar dos sistemas comerciales, la tarjeta AST-YS01 (VITEK 2 System, bioMérieux) y el panel Sensititre Yeast-One (Izasa)

con el método de referencia de microdilución (MD) del CLSI (documento M27-A3) para determinar la sensibilidad de cepas de *Cryptococcus neoformans* a los antifúngicos fluconazol y voriconazol.

Métodos. Se incluyeron 89 aislamientos clínicos de *C. neoformans*. Para la realización de la MD se siguieron las especificaciones del CLSI (Documento M27-A3) con las modificaciones de Ghannoum (J Clin Microbiol 1981;30:2881-2886), y para la determinación de la sensibilidad mediante la tarjeta AST-YS01 (YS-01) y el panel Sensititre (SENSI) se siguieron las recomendaciones de la casa comercial. La lectura con el método de referencia y el SENSI se realizó a las 48 y 72 h. Con la tarjeta AST-YS01 se realizó a las 24 h y en los casos en los que la tarjeta no se había finalizado, se realizó una nueva lectura a las 48 horas. En cada ensayo se incluyeron las cepas control de calidad *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, y las de referencia *C. neoformans* ATCC 90112 y *C. neoformans* ATCC 90113. Los aislamientos de *C. neoformans* con CMI ≥ 16 mg/ml para fluconazol, fueron considerados resistentes y los aislamientos con CMI ≤ 8 mg/ml, sensibles (Aller AI. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:1544-1548). Para voriconazol se utilizaron los puntos de corte especificados en el documento M27-A3. Se consideró error muy grave cuando un aislamiento era resistente por MD y sensible por los dos sistemas comerciales y error grave cuando era sensible por MD y resistente por los sistemas comerciales. Calculamos la correlación según la categoría clínica (CC) de ambos sistemas comerciales en comparación con el método de referencia.

Resultados. El tiempo medio de obtención de resultados con la tarjeta AST-YS01 fue de 23 h (Rango: 15,50-32,75 horas). Para fluconazol, la CC fue del 96,6 % con ambos métodos. Con el sistema VITEK se obtuvieron dos errores muy graves (2,24%) y uno grave (1,12%), y con SENSI tres errores muy graves (3,3%). Ni VITEK 2 ni SENSI fueron útiles para detectar cepas resistentes a fluconazol (2/4, 50% y 1/4, 25% respectivamente). Para voriconazol, la CC con SENSI fue del 96,6%, obteniendo dos errores muy graves (2,24%) y uno grave (1,12%). Con YS01 no pudimos obtener resultados ya que sólo 12 de los 89 aislamientos ensayados crecieron en este sistema (13,5%)

Conclusiones. 1- Los dos sistemas comerciales fallaron en reconocer las cepas resistentes a fluconazol. 2- Ambos métodos fallaron en la detección de las cepas resistentes a voriconazol, aunque los resultados obtenidos con el sistema VITEK 2 fueron mejores que los obtenidos con SENSI. 3- Son necesarios más estudios que incluyan mayor número de cepas resistentes para poder establecer la utilidad de estos dos métodos comerciales en la práctica clínica diaria.

Primer aislamiento de *Cryptococcus gattii* en una especie arbórea autóctona del mediterráneo. Hallazgo a partir de criptococosis en un hurón

Alfonso González Fernández¹, Axelle Mellado Berenguer¹, Manuel Sánchez Angulo¹, Neus Morera², Ferry Hagen³, Teun Boekhout³ y M. Francisca Colom¹

¹Laboratorio de Micología, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

²Clinica Veterinaria Exotics. Barcelona, España

³CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holanda

Antecedentes. *Cryptococcus gattii* es una levadura patógena que causa criptococosis en el ser humano y los animales. Dicha levadura tiene un nicho ecológico descrito en árboles como el eucalipto y otros, pero hasta el día de hoy no había sido aislada de ninguna especie autóctona mediterránea. En el año 2005 nuestro grupo describió el primer caso humano autóctono de criptococosis por esta especie en España (Colom et al, JCM 2005). Desde entonces hemos muestreado sin éxito numerosas especies arbóreas de la zona de residencia del paciente y otras. Hace aproximadamente un año, se nos remitió para estudio una cepa de *C. gattii* procedente de un animal de compañía, un hurón. El estudio de la criptococosis animal fue muy completo (Morera et al. ISHAM 2009) y se encontró la levadura en hisopados nasales de portadores asintomáticos (animales y humanos) relacionados con el hurón enfermo.

Objetivos. Demostrar la presencia del agente patógeno en el medio ambiente y describir, por primera vez, el algarrobo (especie autóctona mediterránea) como posible fuente ambiental de criptococos por *C. gattii*.

Métodos. Se realizó un muestreo intensivo en la localidad donde reside el hurón infectado, en Gavà (Barcelona). Se tomaron un total de 132 muestras, de las cuales 99 fueron hisopados de árboles, entre los que se incluían algarrobos (*Ceratonia siliqua*), pinos (*Pinus halepensis*) y cipreses (*Cupressus sempervirens*); 31 muestras fueron tomadas de suelo y dos muestras de heces de urraca (*Pica pica*) encontradas en el mismo parque. Las muestras recogidas de árboles incluyen hisopados de troncos, ramas, y huecos donde se acumulan restos de materia orgánica, así como los propios acúmulos de detritus. Las muestras se cultivaron en Sabouraud con cloranfenicol y agar Staib para la búsqueda de criptococos patógenos. Los aislamientos obtenidos fueron sometidos a diferentes pruebas fenotípicas de identificación y a estudio de genotipos (MLST, Mating type).

Resultados. Se obtuvieron un total de nueve aislamientos de *C. gattii*, de los cuales cuatro provinieron de algarrobos, y cinco de muestras de suelo. Además, se encontraron tres aislamientos de la especie *Cryptococcus neoformans*, dos en algarrobo y una en suelo. Tras el análisis de genotipos de las cepas de *C. gattii*, se confirmó que todos los aislamientos eran idénticos, y que a su vez coincidían con la cepa aislada en el hurón infectado.

Conclusiones. Se describe por primera vez, la presencia de *C. gattii* en una especie arbórea autóctona del Mediterráneo: el algarrobo. El algarrobo puede ser nicho ecológico y fuente de infección para *Cryptococcus gattii*. Los aislamientos estudiados en el presente caso muestran una alta clonalidad, por lo que se les supone un origen común todavía no descrito.

Hongos filamentosos resistentes: estudio de sensibilidad de nuevos azoles

A. González¹, C. Martín de la Escalera¹, E. López-Oviedo¹, A. Romero¹, M.T. González¹, J. Pemán² y E. Martín-Mazuelos¹

¹UGC de Microbiología, H.U. Virgen de Valme, Sevilla, España

²Hospital Universitario La Fe. Valencia, España

Introducción. La emergencia de hongos filamentosos multirresistentes en las infecciones fúngicas invasoras obliga a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas y hace necesaria la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

Objetivos. Estudiar la actividad in vitro de dos nuevos azoles (posaconazol e isavuconazol) frente a hongos filamentosos emergentes, algunos de ellos habitualmente resistentes, mediante el método de microdilución en caldo (MD).

Material y métodos. Se estudiaron 99 aislamientos de hongos filamentosos: 48 *Aspergillus* spp. (11 *A. flavus*, 12 *A. fumigatus*, 19 *A. terreus*, tres *A. glaucus*, dos *A. niger* y un *A. nidulans*), 18 hifomicetos hialinos (10 *Fusarium* spp., dos *Acremonium* spp., y seis de otras especies), 14 zigomicetos (seis *Mucor* spp., cinco *Rhizopus* spp., y tres de otras especies), y 19 dematiáceos (siete *Scedosporium apiospermum*, cinco *Scedosporium prolificans*, y siete de otras especies). La MD se realizó según normas del CLSI en su documento M38-A2. Rango de concentraciones 0,03 a 16 µg/ml. La lectura se realizó tras 24 horas de incubación a 35 °C, considerando el valor CMI como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir al 100% el crecimiento. Los resultados se expresaron en rango, y CMI90 (µg/ml). QC cepas: *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Cepas de referencia: *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305.

Resultados. Posaconazol: mostró una buena actividad sobre *Aspergillus* spp. y los zigomicetos, con rango (µg/ml) de 0,03-1 y 0,03-0,5 respectivamente y CMI90 0,25 para ambos grupos. No parece activo para hifomicetos y dematiáceos (CMI90 > 16 µg/ml). *Scedosporium* spp. mostró distinta sensibilidad según especie, presentando las CMI más altas *S. prolificans* (>16). Con isavuconazol, mostraron menor CMI los aislamientos de *Aspergillus*, con rango 0,5-4 µg/ml y CMI90 4 µg/ml.

Por especies, *A. fumigatus* y *A. terreus* mostraron mayor sensibilidad, con CMI90 de 2 µg/ml. Cabe destacar la importancia de esta CMI en *A. terreus*, ya que es intrínsecamente resistente a anfotericina B. Los demás hongos estudiados mostraron valores CMI90 > 16 µg/ml, excepto algunas especies de dematiáceos (*Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Phoma* spp.) que presentaron valores CMI más bajos (0,5; 0,5 y 0,03 µg/ml respectivamente).

Conclusiones. 1.- Posaconazol mostró mayor actividad sobre *Aspergillus* spp. y zigomicetos (incluidos *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp.). 2.- Todos los géneros estudiados presentaron valores CMI altos para isavuconazol, excepto *Aspergillus* spp. 3.- Sería necesaria la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de estos hongos multirresistentes.

Identificación de manoproteínas de *Candida albicans* que aumentan la adhesión tumoral al endotelio hepático

Andoni Ramírez García¹, Natalia Gallot², Ana Abad Díaz de Cerio¹, Lorea Mendoza², Aitor Rementería¹, Catalina Requejo¹, Nerea Bilbao¹, Aize Pellón¹, Aitziber Antorán¹ y Fernando Luis Hernando¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Bilbao. Bizkaia

²Pharmakine S.L. Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801, Derio, España

Antecedentes. En los últimos años, los casos de enfermedades hepatoesplénicas en las que interviene *C. albicans* están aumentando su frecuencia en pacientes con cáncer. Estudios epidemiológicos concluyen que la enfermedad más frecuente que subyace a una candidemia en adultos es el tumor sólido; en niños, son las enfermedades hematológicas. El primer lugar donde se retienen los microorganismos que han penetrado en el torrente sanguíneo es la barrera que forman las células endoteliales de la red vascular. En las células endoteliales del hígado ha sido descrita una respuesta inmune frente a moléculas, como LPS o manano, producidas por microorganismos que está mediada por citocinas y que termina con la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 donde se pueden adherir células tumorales. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado recientemente que existe una relación entre la adhesión de *C. albicans* al endotelio sinusoidal hepático (ESH) y el aumento de la adhesión de células tumorales, que las principales moléculas responsables de este efecto son las manoproteínas de *Candida*, y que en el proceso intervienen citocinas como el TNF-α, la IL-1β y la IL-18.

Objetivos. Dado que las principales moléculas implicadas en el aumento de la adhesión tumoral son las manoproteínas, el objetivo de este estudio fue extraer y purificar las manoproteínas de *C. albicans* en cinco subfracciones con distinto peso molecular, comprobar el efecto que ejerce cada una de ellas en la adhesión de células del melanoma B16 (MB16) al ESH de ratón e identificar las manoproteínas implicadas.

Métodos. A partir de un extracto crudo de la cepa *C. albicans* UPV1413 se obtuvieron 5 subfracciones mediante electroforesis preparativa en columna y cromatografía de afinidad en columnas de concanavalina A-sefara de cada una de ellas. La adhesión tumoral del melanoma B16 al ESH se midió por fluorimetría tras incubar las células endoteliales con las diferentes fracciones durante 8 h, e incubar con las células MB16 marcadas con BCEF. Para la caracterización e identificación de las proteínas se realizaron electroforesis bidimensionales y los puntos más importantes se extrajeron y se identificaron mediante huella peptídica.

Resultados. Los resultados muestran que varias subfracciones de *C. albicans*, estimulan significativamente la adhesión de células tumorales al ESH de ratón, siendo la fracción 3 (45 - 66 kDa) la que más adhesión indujo. Los datos obtenidos del análisis por MALDI-TOF mostraron que se trata de una fracción con una gran presencia de antígenos: la proteína disulfuro isomerasa, la cetooácido-reductoisomerasa mitocondrial, la enolasa, la alcohol deshidrogenasa la fructosa-bifosfato aldolasa, la 3-fosfoglicerato quinasa, la isocitrato deshidrogenasa y la ubiquinol

cit-c reductasa. El resto de manoproteínas identificadas fueron las siguientes: la aminopeptidasa Y, el factor de elongación Tu, la actina, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la GDP-manosa pirofosforilasa y la formaldehído deshidrogenasa Glu-dependiente.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que algunas de las manoproteínas del patógeno oportunista *C. albicans* identificadas en este trabajo tienen un importante papel en la respuesta proinflamatoria e inducen un aumento de la adhesión de células tumorales al hígado, pudiendo influir en el desarrollo metastásico en este modelo animal.

***Tinea capitis* en la provincia de Málaga (1974-2007)**

A. Jaén Larriou¹, V. Crespo Erchiga¹, M.A. Rodríguez Iglesias² y J.P. Novalbos Ruiz³

¹Servicio de Dermatología, Hospital Carlos Haya, Málaga, España

²Servicio Microbiología, Hospital Universitario de Puerto Real, Cádiz, España

³Área de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Cádiz, España

Antecedentes. *Tinea capitis* o tiña de la cabeza (TC), es una enfermedad propia de la edad infantil y rara en adultos, afectando preferentemente en este grupo de edad a mujeres postmenopáusicas. Su incidencia está aumentando en los últimos años. La prevalencia de los distintos agentes etiológicos está sujeta a diversos factores y su distribución varía dependiendo de las zonas geográficas, habiéndose comunicado en los últimos años un aumento de infecciones por especies antropófilas.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es estudiar los aspectos epidemiológicos de la TC en la provincia de Málaga durante tres décadas.

Métodos. Estudio retrospectivo de las TC diagnosticadas en el Laboratorio de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital Carlos Haya (1974-2007). Se realizó examen directo con KOH y siembra en agar Sabouraud con y sin actidiona.

Resultados. Observamos 422 casos de TC en el periodo estudiado. El 86,7% de los pacientes eran niños menores de 10 años y sólo el 7,3% mayores de 18 años. Destaca un predominio en los varones (58,5%). En los adultos es más frecuente en mujeres (93,5%). El dermatofito aislado con mayor frecuencia fue *Microsporum canis* (67,8%), seguido de *Trichophyton mentagrophytes* (11,8%), *Trichophyton violaceum* (9,5%), *Trichophyton tonsurans* (5,9%), *Microsporum gypseum* (3,1%), *Microsporum audouinii* (1,2%), *Trichophyton soudanense* (0,5%) y *Trichophyton verrucosum* (0,2%). El 17,5% de los pacientes presentó tiña inflamatoria, cuyo agente principal fue *T. mentagrophytes* (44,6%), seguido de *M. canis* (36,5%).

Conclusiones. 1- En nuestra área sanitaria el dermatofito más frecuente sigue siendo *M. canis*. 2- La TC es más frecuente en niños, con ligero predominio en el varón, invirtiéndose la relación en la edad adulta. 3- Es importante que el dermatólogo conozca e identifique los dermatofitos prevalentes en su área geográfica, para elegir el tratamiento adecuado y establecer medidas para prevenir nuevos contagios.

Sporothrix brunneoviolacea*, una nueva especie del complejo *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii

Hugo Madrid, Josepa Gené, Josep Cano y Josep Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,

IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Antecedentes. El complejo *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* (Ophiostomatales, Ascomycota) incluye numerosas especies morfológicamente muy similares entre sí, presentes principalmente en el suelo y material vegetal. Algunas especies de este complejo son capaces de infectar al hombre y otros vertebrados, afectando piel, tejido subcutáneo y ocasionalmente otras localizaciones. Durante el transcurso de un estudio sobre biodiversidad fúngica en suelos de España, hemos obtenido cuatro aislamientos morfológicamente

similares a *Sporothrix inflata*, un miembro aparentemente no patógeno del complejo *O. stenoceras-S. schenckii*, caracterizado por la presencia de blastoconidios laterales pigmentados y conidióforos simpodiales hinchados en el ápice. Estos aislamientos, sin embargo, producían un pigmento difusible marrón violáceo en cultivo, que no se había descrito previamente en *S. inflata*.

Objetivos. En este estudio se compararon las características fenotípicas y secuencias de ADN de *S. inflata* y especies afines con nuestros aislamientos con el fin de determinar la correcta ubicación taxonómica de estos últimos.

Métodos. Se obtuvieron cepas de referencia de *S. inflata* del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Países Bajos). Estas cepas, conjuntamente con secuencias de otras especies de *Sporothrix* y *Ophiostoma* obtenidas desde GenBank, fueron comparadas con nuestros aislamientos usando un esquema de taxonomía polifásica que incluyó el análisis filogenético por separado y de forma combinada de secuencias parciales del gen de la β -tubulina y la región ITS del ADNr mediante el método *neighbor-joining*. La caracterización fenotípica se basó en determinar lo siguiente: (i) las velocidades de crecimiento y morfología de las colonias en agar patata dextrosa a distintas temperaturas, (ii) la micromorfología de los aislamientos a partir de microcultivos en agar harina de maíz, y (iii) los perfiles de asimilación de sacarosa, rafinosa y ribitol.

Resultados. El análisis filogenético agrupó nuestros aislamientos en un clado con buen soporte estadístico, distinto de *S. inflata* y otras especies del complejo *O. stenoceras-S. schenckii*. Aunque nuestros aislamientos no se diferenciaron claramente de *S. inflata* por sus velocidades de crecimiento a distintas temperaturas, sí se observaron diferencias en el aspecto de las colonias, en la micromorfología y en la capacidad para asimilar rafinosa. Mientras que *S. inflata* produjo colonias sin pigmentos difusibles, blastoconidios laterales pigmentados predominantemente ovoides y no asimiló rafinosa, los aislamientos de España produjeron colonias con un pigmento difusible marrón violáceo, blastoconidios laterales pigmentados predominantemente globosos y asimilaron rafinosa. Las relaciones filogenéticas y características fenotípicas de nuestros aislamientos los distinguen claramente de todas las especies conocidas de *Sporothrix* y *Ophiostoma*; por ello, se proponen como una especie nueva para la ciencia bajo el nombre de *Sporothrix brunneoviolacea*.

Conclusiones. El análisis combinado de secuencias de ADN, fisiología y morfología han permitido describir una nueva especie de *Sporothrix*, fenotípicamente muy cercana a *S. inflata*. Esta nueva especie, *S. brunneoviolacea*, podría ser confundida también con otras especies de *Sporothrix* que producen blastoconidios laterales pigmentados y que se aíslan frecuentemente en clínica, tales como *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* y *S. schenckii*, sin embargo estas especies crecen a 35 °C, a diferencia de *S. brunneoviolacea* que no crece a esta temperatura.

Comparación de métodos comerciales para la determinación de sensibilidad a los antifúngicos de hongos filamentosos del género *Aspergillus*

Marçal Mariné¹, Jonathan Cabezas¹, Arantza Sáez¹, María Dolores Moragues² y José Pontón¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

²Departamento de Enfermería, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Antecedentes. En las últimas décadas se ha incrementado el número de pacientes con supresión inmunitaria, los cuales tienen un mayor riesgo de sufrir una infección fúngica invasora. El éxito en el tratamiento dependerá en gran parte del diagnóstico rápido y de la disponibilidad de agentes antifúngicos que sean eficaces frente a las levaduras u hongos filamentosos causantes de la infección. No se han descrito puntos de corte de relevancia clínica para los hongos filamentosos. Sin embargo, el conocimiento de la sensibilidad in

vitro a los antifúngicos de las cepas aisladas en procesos clínicos, puede identificar aquellos aislamientos con menor probabilidad de respuesta frente a una terapia específica.

Objetivos. Comparar los métodos comerciales Neo-Sensitabs, Etest y el nuevo MIC TEST STRIP con el método de referencia M38-A2 del CLSI para la determinación de sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos del género *Aspergillus*.

Métodos. Se estudiaron tres cepas de *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305, CECT2071, AF293), y nueve aislamientos de *Aspergillus flavus* junto con dos cepas de referencia (ATCC 204304, CECT 2685). Como controles para los ensayos se utilizaron *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Paecilomyces variotii* (ATCC 22319). Se determinó la sensibilidad a los antifúngicos anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), itraconazol (ITZ), posaconazol (PSZ) y voriconazol (VRZ) por el método de referencia M38-A2 del CLSI, registrándose la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las 24 y 48 h de incubación a 35 °C, así como la concentración mínima eficaz (CME) para la CAS a las 24 h. Se ensayó el método de difusión con tabletas Neo-Sensitabs (A/S Rosco. Taastrup, Dinamarca) para AMB, ITZ y VRZ, efectuándose la lectura tras 24 h de incubación a 35 °C en agar Mueller-Hinton. Se determinaron en paralelo las CMIs para AMB y VRZ mediante tiras Etest (bioMérieux, Suecia) y una nueva presentación comercial (MIC TEST STRIP. Liofilchem, Italia) efectuándose lecturas a las 24 y 48 h de incubación a 35 °C en agar RPMI-glucosa 2%.

Resultados. Las cepas ensayadas de *A. flavus* y *A. fumigatus* resultaron sensibles a AMB (0.5-1 µg/ml) por el método M38-A2. Las CMIs con las tiras Etest y MIC TEST fueron similares y no distaban más de una dilución de las del M38-A2, con la misma interpretación como cepas sensibles a AMB. Contrariamente, utilizando tabletas Neo-Sensitabs las cepas fueron clasificadas como sensibles, intermedias y resistentes a AMB. Las cepas de *A. fumigatus* se mostraron sensibles al VRZ por los cuatro métodos. Sin embargo, mientras que las tiras y tabletas pusieron de manifiesto la sensibilidad de todas las cepas de *A. flavus* a este antifúngico, por el método de microdilución M38-A2 algunas de ellas se mostraron poco sensibles a VRZ, con CMIs superiores a 1 µg/ml. Todas las cepas fueron sensibles a ITZ, PSZ y CAS.

Conclusiones. Para AMB y VRZ existe una buena correlación entre las tiras Etest y MIC TEST STRIP. Las CMIs para AMB por MIC TEST STRIP se aproximan a las obtenidas por M38-A2 del CLSI.

Prevalencia de *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis* en una colección de hongos durante un periodo de 12 años

Ilargi Miranda-Zapico¹, Elena Eraso¹, José Luis Hernández Almaraz², Alfonso Javier Carrillo Muñoz³, Juan Manuel Hernández Molina⁴ y Guillermo Quindós¹

¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

²Servicio de Microbiología, Hospital de Cruces, Barakaldo, España

³ACIA-Microbiología, Barcelona, España

⁴Servicio de Microbiología, Hospital Carlos Haya, Málaga, España

Antecedentes. *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* se han descrito recientemente como dos nuevas especies que pertenecían con anterioridad al grupo de *Candida parapsilosis* (*sensu lato*). Estas especies no se pueden diferenciar mediante métodos de identificación convencionales. Existe un interés creciente en conocer el papel etiológico de estas especies, porque *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) es la segunda especie aislada con mayor frecuencia de hemocultivos en España.

Objetivo. Estudiar la prevalencia de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* entre los aislamientos clínicos identificados previamente como *C. parapsilosis*.

Métodos. Se estudiaron 194 aislamientos clínicos procedentes de nuestra colección de levaduras (desde 1996 hasta 2007), que incluían 82 aislamientos procedentes de hemocultivos y otros fluidos estériles,

26 de vagina, 52 de mucosa oral, 11 de piel y 23 de otros orígenes clínicos. Se incluyeron como cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y ATCC 90018, *C. metapsilosis* ATCC 96143 y ATCC 96144 y *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y ATCC 96141. Todas las cepas habían sido identificadas como *C. parapsilosis* por métodos convencionales. *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* fueron identificadas por amplificación del ADN seguido de AFLP según el método descrito por Tavanti et al. (*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 284-292). Brevemente, se amplificó una región de 716 pb del gen SADH (alcohol deshidrogenasa secundaria) y se digirió con la enzima BanI. *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* contienen, uno, tres y ningún espacio de restricción, respectivamente.

Resultados. Ciento setenta y nueve aislamientos se identificaron como *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) (92,27%), 10 como *C. metapsilosis* (5,15%) y cinco como *C. orthopsilosis* (2,58%). Dos aislamientos de *C. metapsilosis* procedían de vagina (7,69% del total de aislamientos de vagina), uno de sangre (1,22% de los aislamientos de sangre y otros fluidos estériles), tres de piel (27,27% del total de aislamientos de piel) y cuatro de otros orígenes clínicos (17,39% del total de los aislamientos de otros orígenes clínicos). *C. metapsilosis* se aisló con mayor frecuencia de muestras de piel en comparación con el resto de aislamientos ($p=0,0003$). *C. orthopsilosis* fue aislada en una muestra vaginal (3,85% del total de aislamientos de vagina), en una de sangre (1,22% del total de las muestras aisladas en sangre y otros fluidos estériles), en una de la mucosa orofaríngea (1,92% del total de muestras aisladas de mucosa), y en dos de otros orígenes clínicos (8,70% del total de muestras de otros orígenes clínicos).

Conclusión. *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* eran un 2,44% (1,22% para cada especie) de los aislamientos obtenidos de episodios de candidiasis invasivas atribuidos previamente a *C. parapsilosis*. Asimismo, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* fueron la causa de candidiasis superficiales, con una incidencia significativamente mayor de *C. metapsilosis* en estas infecciones.

Financiación. GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), S-PE08UN35 (Saiotek 2008, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco) y PI061895/2006 (FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo de España).

Biodiversidad, factores de virulencia y sensibilidad in vitro a los antifúngicos de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis* (*sensu lato*)

Marcelo Ortega-Riveros, Ilargi Miranda-Zapico, Elena Eraso y Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

Antecedentes. *Candida parapsilosis* se aísla cada vez más frecuentemente como causante de candidiasis invasora y de candidemias, sobre todo asociadas a catéteres intravenosos y alimentación parenteral. La reciente división de *C. parapsilosis* en tres especies hace necesario el estudio de los factores de virulencia de las nuevas especies *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*.

Objetivos. Estudiar el cambio fenotípico (*switching*), la expresión de enzimas extracelulares, la producción de biopelículas y la sensibilidad in vitro a los antifúngicos del complejo *C. parapsilosis*.

Métodos. Se estudiaron 47 aislamientos clínicos, entre los que se incluyeron 27 *C. parapsilosis*, 10 *Candida metapsilosis* y 10 *Candida orthopsilosis*. El número de aislamientos y su origen clínico fueron los siguientes: 19 aislamientos de sangre, ocho orales, cinco vaginales, tres de tetinas de biberón, tres de exudado ótico, dos de piel y heridas, uno de tráquea, uno de esputo, uno de orofaríngea, uno de ano, y otro de origen desconocido. Además, se estudiaron las cepas de colección *C. parapsilosis* ATCC 90018 y ATCC 22019, *C. metapsilosis*

ATCC 96143 y ATCC 96144 y *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y ATCC 96141. El *switching* se estudió en un medio mínimo de Lee con floxina B, suplementado con tres aminoácidos (lisina, valina, alanina). También se llevó a cabo la detección de biopelículas producidas en poliestireno por un método colorimétrico (reducción de la sal de tetrazolio XTT), la producción de proteinasa y fosfolipasa por métodos en placa, y la sensibilidad a los antifúngicos con el método Sensititre YeastOne9 (Trek Diagnostics Systems, USA).

Resultados. *C. metapsilosis* mostró la menor plasticidad fenotípica, con una capacidad de *switching* que se limitaba al color de las colonias, mientras que *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) mostró la mayor variabilidad morfológica. No se detectó actividad proteinasa en *C. metapsilosis* ni *C. orthopsilosis*, mientras que en *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) la producción fue más frecuente en las cepas con fenotipo inicial rugoso. La producción de biopelículas era de categoría intermedia, aunque la producción por las cepas con fenotipo rugoso de *C. parapsilosis* fue significativamente mayor que la del resto de cepas evaluadas. Las tres especies fueron sensibles a la mayoría de los antifúngicos, pero se observó una sensibilidad dependiente de la dosis a itraconazol, y un 4% de los aislamientos de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) fueron no sensibles a anidulafungina.

Conclusiones. No se observó una correlación entre el origen anatómico de los aislamientos y la expresión de factores de virulencia in vitro, aunque los aislamientos de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) con morfotipo rugoso mostraron una mayor expresión de estos factores.

Financiación. Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), S-PE08UN35 (Saiotek 2008, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco) y PI061895/2006 (Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España).

Efecto antifúngico del quitosano: sensibilidad diferencial de hongos filamentosos

Javier Palma Guerrero¹, Hans-Börje Jansson¹, Jesús Salinas¹, Nick D. Read² y Luis Vicente López-Llorca¹

¹Laboratorio de Fitopatología, IMEM Ramón Margalef, Dept. Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Universidad de Alicante

²Fungal Cell Biology Group, University of Edinburgh, Reino Unido

Antecedentes. El efecto fungicida del quitosano ha sido ampliamente estudiado, y se ha observado que el quitosano inhibe tanto el crecimiento de las hifas como la germinación de las esporas en hongos fitopatógenos. A pesar de los numerosos estudios realizados hasta la fecha, no se ha estudiado el efecto del quitosano sobre hongos beneficiosos para las plantas, como es el caso de los hongos agentes de control biológico. Además de ello, el modo de acción del quitosano como antifúngico se conoce muy vagamente.

Objetivos. Estudiar la sensibilidad al quitosano de hongos agentes de control biológico y compararla con la de los hongos fitopatógenos. Estudiar el modo de acción antifúngico del quitosano.

Métodos. Investigamos el efecto del quitosano en el crecimiento de la colonia y la germinación de los conidios de hongos fitopatógenos y hongos agentes de control biológico (nematófitos, entomopatógenos y micoparásitos). Mediante microscopía electrónica de transmisión se estudió la ultraestructura de los conidios tratados con quitosano. Se utilizó quitosano marcado con rodamina para seguir la entrada del quitosano a la célula por microscopía confocal láser. Ayudándonos del hongo modelo *Neurospora crassa*, estudiamos la permeabilización de la membrana plasmática causada por el quitosano mediante microscopía confocal láser en combinación con marcadores fluorescentes específicos. Finalmente, la permeabilización de la membrana plasmática se confirmó mediante luminometría.

Resultados. Observamos que el quitosano inhibe en mayor medida el crecimiento de los hongos fitopatógenos y micoparásitos que el de los hongos nematófitos y entomopatógenos, llegándose a observar aumento de crecimiento en estos últimos a concentraciones que

inhibían el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Se observó un resultado similar con la germinación de las esporas, resultando las esporas de los hongos fitopatógenos y micoparásitos más sensibles a quitosano. Además, los conidios resultaron ser, en general, más sensibles a quitosano que el crecimiento de la colonia. Mediante microscopía electrónica de transmisión se observó que el quitosano provoca grandes alteraciones en la ultraestructura de los conidios del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *racis-lycopersici*, tales como desorganización del citoplasma, retracción de la membrana plasmática y pérdida del contenido celular. Por el contrario, en el hongo nematófito *Pochonia chlamydosporia* se observó una mezcla de conidios afectados y no afectados. Mediante microscopía confocal, utilizando quitosano marcado con rodamina, pudimos observar que a los 15 minutos de su aplicación el quitosano penetra en los conidios. La entrada del quitosano en la célula podía inhibirse al tratar previamente los conidios con azida sódica o baja temperatura, tratamientos que inhiben la producción de energía por la célula. Con la ayuda del hongo modelo *Neurospora crassa*, pudimos comprobar que la entrada del quitosano a la célula se produce por permeabilización de la membrana plasmática, tratándose de una permeabilización dependiente de energía celular, y que depende del tipo celular. Esto pudo ser confirmado por luminometría.

Conclusiones. Los hongos nematófitos y entomopatógenos son compatibles con el quitosano, lo que sugiere que pueden aplicarse combinados con dicho compuesto para el control biológico de patógenos de plantas. El quitosano mata las esporas de los hongos fitopatógenos, y de *Neurospora crassa*, tras permeabilizar su membrana plasmática mediante un proceso dependiente de energía.

Diseño de un sistema de tipificación mediante secuenciación multilocus de *Scedosporium aurantiacum*

Haybrig Perdomo¹, Harun Azian², Felix Gilgado², Wieland Meyer², Josep Cano¹ y Josep Guarro¹

¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

²Molecular Mycology Research Laboratory, University of Sydney, Western Clinical School at Westmead Hospital, Westmead Millennium Institute, Sydney, Australia

Antecedentes. En los últimos años se ha reportado un incremento en el número de infecciones en el hombre causadas por especies del género *Scedosporium*, y más concretamente por *Scedosporium aurantiacum*. Esta especie, ha sido la responsable de numerosos casos de escedosporiosis invasora en pacientes inmunocomprometidos de diferentes países, mayoritariamente Australia, existiendo pocos estudios que relacionen la epidemiología, el modo de transmisión, la virulencia y resistencia antifúngica de este hongo. Por ello, se pretende establecer un sistema *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para esta especie, considerado como el más eficiente para abordar estudios epidemiológicos de los microorganismos.

Objetivo. Diseñar un sistema de tipificación mediante secuenciación multilocus (MLST) para el hongo patógeno *S. aurantiacum*.

Método. Se seleccionaron 12 aislamientos identificados morfológica y molecularmente como *S. aurantiacum* de distintos orígenes anatómico-patológicos y procedencias geográficas. Se seleccionaron 20 fragmentos de diferentes genes ribosomales y estructurales, con vistas a evaluar su potencial para formar parte de un esquema MLST de tipificación.

Resultados. Del total de fragmentos estudiados, en siete de ellos no se obtuvo amplificado alguno. De los 13 restantes se seleccionaron siete, atendiendo al número de posiciones variables de los mismos para *S. aurantiacum*: β -tubulina (*TUB*, *BT2*), factor de elongación 1-alfa (*EF1- α*), calmodulina (*Cal*), manganeso superóxido dismutasa (*SOD2*), subunidad B de la RNA polimerasa II (*RPB-2*) y los dominios D1-D2 del gen 28S del rRNA. Estos siete *loci* permiten definir un esquema MLST lo suficientemente robusto para abordar estudios epidemiológicos de esta especie.

Técnicas de PCR para diferenciar y detectar hongos filamentosos del género *Aspergillus* mediante código binario

Ana Abad¹, Jímena Victoria Fernández Molina¹, Fernando Luis Hernando¹, Javier Garaizar² y Aitor Rementería¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Campus de Leioa, Vizcaya, España

²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Campus de Vitoria/Gasteiz, de la UPV/EHU, España

Antecedentes. La diferenciación entre especies del género *Aspergillus* depende de la obtención del cultivo, sus características macroscópicas y microscópicas, de la detección de las formas sexuales y de diferentes reacciones físico-químicas. También pueden usarse técnicas moleculares como la amplificación por PCR de las secuencias ITS ribosómicas y el análisis comparativo de las mismas en diferentes bases de datos para discriminar a nivel de sección, o la amplificación, secuenciación y análisis comparativo de la secuencia de otros genes como la β -tubulina para discriminar a nivel de especie.

Objetivos. Utilizar técnicas de PCR diseñadas para genes de virulencia de *A. fumigatus* para discriminar entre diferentes especies del género *Aspergillus* y otros hongos filamentosos mediante un sistema de código binario.

Métodos. Cepas: *A. fumigatus* CECT 2071, Farm1 (suministrada por el Dr. Jorge Guisantes), AF-293 (TIGR); *A. flavus* CECT 2685; *A. niger* CECT 2091; *A. terreus* CECT 2663; *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) CECT 2544; *A. versicolor* CECT 2664; *A. lentulus* AL-1, *Neosartoria udagawae* UPV 06-91 y *Scedosporium prolificans* UPV 99-059 (suministradas por la Dra. María Dolores Moragues); *Penicillium glabrum* CECT 20553; *P. chrysogenum* CECT 20772. Dianas génicas: se seleccionaron los siguientes genes de *A. fumigatus*: síntesis de melanina: *alb1*, *arp1*, *abr1*, *abr2* y *ayg1*; hidrofobinas: *rodA* y *rodB*; toxinas: *mitF* y *aspHS*; proteasas: *alp*, *alp2*, *mep*, *mep20*, *mepB*, *pep*, *pep2*, *dppIV* y *dppV*; fosfolipasas: *plb1* y *plb2*; resistencia a compuestos tóxicos de oxígeno: *catA*, *cat1*, *cat2* y *sod*; otros: *pabaA*, *pyrG*, *ras2*, *rhaA* y *hsp1*. Procedimiento: Se diseñaron cebadores específicos y se optimizaron las condiciones de amplificación con ADN de *A. fumigatus*, para obtener un único producto detectado mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se aplicaron las técnicas de PCR diseñadas sobre ADN extraído de cada especie de hongo y se consideró el resultado como positivo (valor 1) si se obtenía un amplificado del mismo tamaño que el esperado sobre *A. fumigatus*, y negativo en caso contrario (valor 0). La combinación de los resultados de diferentes PCR permitió la obtención de un código binario para cada hongo.

Resultados. Los resultados obtenidos con la combinación de las PCR para los genes *rodA*, *mepB*, *dppV* y *cat2* permiten diferenciar entre sí nueve de las especies de hongos filamentosos estudiados. Las reacciones diseñadas para los genes *alb1*, *arp1*, *abr1*, *catA*, *dppIV*, *pyrG*, *ras2* y *rhaA* permiten de forma independiente diferenciar *A. fumigatus*, *A. lentulus* y *N. udagawae* de otras ocho especies de hongos filamentosos. Cualquiera de las reacciones de los genes *rodB*, *mitF*, *aspHS*, *mep20*, *pep* o *pabaA* permiten diferenciar *A. fumigatus* y *A. lentulus* de *N. udagawae*. En ningún caso se pudieron diferenciar entre sí *A. fumigatus* y *A. lentulus*.

Conclusiones. Aunque se debe profundizar en el estudio de este sistema aumentando el número de especies y cepas de cada especie, e incluso buscando nuevas dianas génicas, este sistema de código binario mediante PCR y electroforesis convencional puede ser útil en la diferenciación de las especies de hongos filamentosos estudiados. **Subvenciones.** Subproyecto DIAMOLFUN del proyecto IEO9 del Gobierno Vasco y Subvención General a Grupo de Investigación de la Universidad del País Vasco GIU 05/42 y GIU 08C/20.

Eficacia del posaconazol en la infección diseminada por *Aspergillus terreus* en un modelo murino

Valentina Salas, M. del Mar Rodríguez, F. Javier Pastor, Enrique Calvo, Emilio Mayayo y Josep Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Objetivo. Evaluar la actividad in vitro e in vivo del posaconazol (PSC) frente a *Aspergillus terreus*.

Materiales y métodos. El estudio in vitro se realizó con 21 cepas de *A. terreus* por el método de microdilución del CLSI y el de difusión de disco (Neo Sensitabs®). Se desarrolló un modelo murino de infección diseminada usando seis cepas de *A. terreus*. El estudio in vivo fue llevado a cabo con dosis de 5, 10 y 20 mg/kg de PSC administradas dos veces al día durante siete días. Los niveles de PSC plasmáticos y en bazo fueron estimados mediante bioensayo el cuarto día de tratamiento. También se determinaron los niveles séricos de galactomanano usando Platelia *Aspergillus*® el séptimo día de tratamiento, considerándose como positivos los índices de galactomanano >1,5.

Resultados. Todas las cepas fueron sensibles in vitro al PSC con ambos métodos de determinación. El PSC a dosis de 20 mg/kg, y en algunos casos a 10 mg/kg, prolongaron significativamente la supervivencia de los ratones infectados y redujeron la carga fúngica en riñón, pulmón y cerebro. Los niveles de PSC séricos y en bazo fueron más altos que los valores CMI correspondientes. Los niveles séricos de galactomanano fueron negativos para los animales tratados con todas las dosis de PSC; en cambio, los ratones que no recibieron tratamiento fueron positivos para este antígeno.

Conclusión. PSC podría ser una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones sistémicas por *A. terreus*.

Una nueva especie de *Aspergillus* aislada de pacientes y ambiente hospitalario en Brasil

Sarah S. Gonçalves¹, Alberto M. Stchigel², Josep Cano², Analý S. Melo¹, Patricio C. Godoy³, Arnaldo Colombo¹ y Josep Guarro²

¹Departamento de Medicina, Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

²Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

³Universidad Austral del Chile, Valdivia, Chile

Antecedentes. Durante un estudio de incidencia de *Aspergillus* spp. en ambiente hospitalario en Brasil, se aislaron tres cepas interesantes, morfológicamente relacionadas con *A. parasiticus*.

Objetivos. El objetivo del presente estudio fue la caracterización morfológica y molecular de estos aislamientos.

Métodos. Los aislamientos de Brasil fueron comparados con cepas tipo y de referencia de diferentes especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. Los caracteres evaluados fueron los siguientes: secuencias nucleotídicas de los genes de la acetamidasa (*amdS*) y de la O-metiltransferasa (*omtS*), caracteres micro-macromorfológicos, pruebas fisiológicas relevantes, incluyendo la asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como la producción de aflatoxinas.

Resultados. El análisis filogenético de los datos de las secuencias demostró que los tres aislamientos de Brasil formaban un grupo altamente soportado, separado de las otras especies incluidas en este estudio. Estas cepas también presentaron diferentes características morfológicas y fisiológicas cuando fueron comparadas con otras especies próximas. Los conidios de estos aislamientos eran lobado-reticulados y el estipe verrugoso con pocos septos. A diferencia de las otras especies, los aislamientos de Brasil fueron incapaces de asimilar el ácido tánico y el nitrito de potasio. Estos aislamientos tampoco fueron capaces de producir ácido en agar creatina sacarosa, pero fueron productores de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

Conclusiones. Nuestros resultados indican que estos aislamientos podrían considerarse como una nueva especie de *Aspergillus*.

Colonización oral por *Candida* y *Staphylococcus* en portadores de prótesis orales

Aketza Varona Barquín¹, Cristina Marcos-Arias¹, Elena Eraso¹, José López-Vicente², Asier Eguía², Andoni De-Juan², José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

²*Cátedra de Medicina Bucal, Departamento de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España*

Antecedentes. La estomatitis protética es una patología oral de etiología multifactorial (prótesis, tabaco, dieta, pH). *Candida* está implicada mediante la colonización de la mucosa y las prótesis orales donde desarrolla biopelículas resistentes a los antimicrobianos. Esta resistencia es mayor en las biopelículas mixtas de *Candida* y *Staphylococcus*.

Objetivos. Describir la frecuencia de la colonización oral de *Candida* y *Staphylococcus* en portadores de prótesis.

Métodos. Se estudiaron cien muestras orales (de prótesis y mucosa subyacente) de cien portadores de prótesis, cuarenta y cinco de ellos con estomatitis protética. Las muestras se cultivaron en agar sangre y en medios cromógenos (ChromID *Candida* y ChromID *S. aureus*, bioMérieux, Francia). Los aislamientos fueron identificados por métodos convencionales y moleculares. El test de detección Slidex MRSA (bioMérieux) se usó para la evaluación de la resistencia a meticilina.

Resultados. Se obtuvieron 79 aislamientos de levaduras de 40 pacientes con estomatitis protética. *Candida albicans* fue la especie más abundante (58 aislamientos, 73,4%), seguida de *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* (siete aislamientos cada una, 8,9%), *Candida parapsilosis* (dos, 2,5%), *Saccharomyces cerevisiae* (dos, 2,5%) y *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* y *Candida krusei* (un aislamiento -1,3%- de cada una). Cincuenta y cinco aislamientos de *Staphylococcus* se obtuvieron de 21 pacientes con estomatitis protética. *Staphylococcus aureus* se aisló de tres pacientes, *Staphylococcus epidermidis* de 14

(dos aislamientos fueron resistentes a meticilina) y *Staphylococcus warneri* de ocho (siendo uno resistente a meticilina). En 19 pacientes con estomatitis protética se observó una colonización mixta de *Candida* y *Staphylococcus*. La combinación más frecuente fue *C. albicans* con *S. epidermidis* (cuatro pacientes), seguida de *C. albicans* con *S. warneri* (tres pacientes). Un paciente fue colonizado por *C. dubliniensis*, *C. krusei* y *S. aureus*. Se obtuvieron 73 aislamientos de 38 individuos con prótesis oral y sin estomatitis protética. *C. albicans* fue la especie predominante (43 aislamientos, 58,9%), seguida de *C. tropicalis* (11, 15,1%), *C. guilliermondii* (10, 13,7%), *C. glabrata* (siete, 9,6%) y *C. parapsilosis* (dos, 2,7%). De los 25 portadores de prótesis oral sin estomatitis protética, se obtuvieron 59 aislamientos de *Staphylococcus*: *S. aureus* en cuatro pacientes, *S. epidermidis* en 10, *S. warneri* en 11 y *S. capitis* y *S. saprophyticus* en dos pacientes cada uno. Trece pacientes fueron colonizados a la vez por *Candida* y *Staphylococcus*. *C. albicans* fue aislada más frecuentemente en pacientes con estomatitis protética ($p=0,0016$) y estaba presente en todos los pacientes con estomatitis protética del tipo III. En cambio, *C. guilliermondii* estaba asociada con portadores de prótesis orales sin estomatitis protética ($p=0,0444$).

Conclusiones. *Candida* y *Staphylococcus* se aislaron de prótesis y de mucosa oral. *Candida albicans* se asoció directamente con la presencia de estomatitis protética. La cavidad oral es un reservorio potencial de especies de *Staphylococcus* resistentes a meticilina.

Financiación. Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), y PI061895/2006 (Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo de España).