

## Evaluación de nuevos métodos o sistemas diagnósticos y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos

---

490

---

### **SENSIBILIDAD A NUEVOS ANTIMICROBIANOS DE MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO**

L. García-Agudo<sup>1</sup>, P. García-Martos<sup>2</sup>, I. Jesús de la Calle<sup>1</sup>  
y M. Rodríguez-Iglesias<sup>1</sup>

*Servicio de Microbiología, <sup>1</sup>Hospital Universitario de Puerto Real  
(Cádiz), <sup>2</sup>Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz)*

**Objetivo:** Conocer la sensibilidad a nuevos antimicrobianos  
de distintas especies de micobacterias de crecimiento rápido  
(MCR).

**Material y métodos:** Ensayamos 54 cepas de MCR aisladas de pacientes atendidos en los Hospitales Universitarios de Puerto Real y Puerta del Mar (Cádiz) durante los años 2000 a 2006. Estas cepas pertenecían a 12 especies diferentes: 23 *M. fortuitum*, 11 *M. chelonae*, 10 *M. abscessus*, 2 *M. senegalense*, y una especie de cada una de las siguientes: *M. alvei*, *M. brumae*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *M. neoaurum*, *M. peregrinum*, *M. septicum* y *M. smegmatis*. La identificación de las mismas se realizó atendiendo a sus características fenotípicas y bioquímicas, análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA) y secuenciación del gen 16S ARN ribosómico. La sensibilidad se determinó mediante el método E-test frente a nueve antimicrobianos: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, levofloxacino, claritromicina, imipenem, linezolid, quinupristina/dalfopristina y tigeciclina.

**Resultados:** Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a amikacina y tigeciclina. Por el contrario, la sensibilidad a quinupristina/dalfopristina fue muy escasa. De las especies más habituales en clínica, *M. fortuitum* presentó buena sensibilidad a cefoxitina (74%), ciprofloxacino (87%), levofloxacino (91%), claritromicina (78%) e imipenem (83%); mientras que *M. chelonae* sólo mostró buena sensibilidad frente a linezolid (91%) y *M. abscessus* frente a claritromicina (80%). Las demás especies presentaron una sensibilidad muy variable a cefoxitina, ciprofloxacino, levofloxacino, claritromicina, imipenem y linezolid.

**Conclusiones:** El comportamiento de las distintas especies de MCR frente a los antimicrobianos es desigual. Entre los antimicrobianos ensayados, amikacina y tigeciclina presentan una excelente actividad frente a todas las especies. *M. fortuitum* es más sensible al conjunto de antimicrobianos que las otras especies habituales en clínica. En cuanto al resto de las especies incluidas en nuestro estudio, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. neoaurum*, *M. peregrinum* y *M. septicum* son las especies más sensibles, mientras que *M. brumae* y *M. smegmatis* son las que presentan mayor espectro de resistencia.

## 491

### EVALUACIÓN DEL MÉTODO CROMOGENICO CICA-BETA-946 TEST PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), METALOBETALACTAMASAS (MBL) Y AMPC DESRREPRIMIDAS

M.I. Morosini, A. Valverde, M. Tato, F. Almaraz, M. Martínez-Ferrer y R. Cantón

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal.

**Objetivo:** Inferir la presencia de ciertas betalactamasas (BL) es en ocasiones difícil, sobre todo cuando se producen varias enzimas a la vez. Se evaluó el Cica-β-Test (Kanto Chemical Co., Japón, distribuido por Lab. Leti) sistema de detección rápida que emplea HMRZ-86 (cefalosporina cromogénica no hidrolizada por penicilinasas clásicas) en combinación con inhibidores, que permite deducir la presencia de BLEE, MBL o AmpC desrreprimida.

**Material y métodos:** Se estudiaron 80 cepas, 76 de origen clínico, *E. coli* (37), *K. pneumoniae* (17), *K. oxytoca* (4), *E. cloacae* (6), *E. aerogenes* (1), *C. freundii* (2), *C. amalonaticus* (1) y *S. enterica* (1) cuyas BL (TEM-4, 24, 27, 52; SHV-2, 5, 11, 12, 15; CTX-M-1, 2, 9, 10, 14, 15, 32; AmpC desrreprimida; K1; CdiA; VIM-1 y penicilinasas clásicas (7) se habían caracterizado por métodos moleculares. Otros controles incluidos: 1 *E. coli* con VIM-1 y las cepas ATCC *K. pneumoniae* 700603, *E. coli* 35218 y *E. coli* 25922. Se empleó un cultivo de 18 h en placa de M H agar con discos de cefotaxima y cefotaxidima tomando 1 a 3 colonias del borde de los halos de inhibición (o su equivalente cuando no había halo) y se continuó según las instrucciones del fabricante.

**Resultados:** Tabla 1. Globalmente, el método presenta una sensibilidad de 96% y una especificidad de 64,3%. Los valo-

res predictivo positivo (VPP) y predictivo negativo (VPN) son 93,5% y 75%, respectivamente. En el grupo de las BLEE, la sensibilidad es de 96,4% con un VPP del 100%.

**Conclusiones:** Un resultado positivo a las 24 h advierte de la posible existencia de un aislado multirresistente. Los resultados inequívocos que indiquen la presencia de un tipo de BL ayudarían a establecer o modificar la terapia antimicrobiana. Esta prueba es útil para el cribado de cepas y es un complemento de los métodos fenotípicos habituales, limitada por la dificultad de diferenciar BL cuando éstas coexisten en un mismo aislado.

Tabla 1. Resultados globales obtenidos con el Cica-β-Test

Betalactamasa inferida con Cica-β-Test						
Enzimas caracterizadas	BLEE	MBL	AmpC	Múltiples	Penicilinasas <sup>a</sup>	Sin actividad <sup>b</sup>
BLEE (56) <sup>c</sup>	54	-	-	-	-	2
MBL (1) <sup>d</sup>	-	1	-	-	-	-
AmpC desrreprimida (7)	-	-	5	1	-	1
K1 (3)	1	-	2	-	-	-
BLEE + MBL (2)	-	-	-	2	-	-
AmpC + MBL (1)	-	-	-	1	-	-
CdiA (1) <sup>e</sup>	-	-	-	1	-	-
TEM-1 (4) <sup>f</sup>	-	-	-	-	8	8
SHV-1 (4)	-	-	-	-	-	-
Control negativo (1) <sup>g</sup>	-	-	-	-	-	1

<sup>a</sup>confirmadas con Nitrocefina; <sup>b</sup>frente a HMRZ-86; <sup>c</sup>incluye *K. pneumoniae* ATCC 700603; <sup>d</sup>transconjugante *E. coli* BM21; <sup>e</sup>*C. amalonaticus*; <sup>f</sup>incluye *E. coli* ATCC 35218; <sup>g</sup>*E. coli* ATCC 25922

## 492

### MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAR AUTOMÁTICAMENTE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* A LOS INHIBIDORES DE LA BETA-(1,3)-D-GLUCANO SINTASA.

A. Basilio, F. Vicente, J. Collado, D. Salvachúa, P. Gómez y F. Peláez

Centro de Investigación Básica (CIBE). Centro de Investigación Básica, Merck Sharp and Dohme de España, Madrid, España.

**Objetivos:** La actividad de los inhibidores de la β-(1,3)-D-glucano sintasa frente a *Aspergillus fumigatus* es difícil de medir porque los puntos de corte de las CMI obtenidas en ensayo líquido no se correlacionan bien con la actividad "in vivo" de éstos compuestos. Por lo tanto, en vez de las CMI se suelen utilizar las CME (concentración mínima efectiva) de forma visual o por microscopía. Esta circunstancia representa un problema a la hora de ensayar productos naturales a gran escala para el descubrimiento de nuevos agentes antifúngicos.

**Métodos:** Para evaluar el crecimiento de *A. fumigatus* en medio líquido, se ha utilizado medio RPMI 1640 modificado. Las lecturas espectrofotométricas se han realizado a 600 nm, en un multilector de placas TECAN Ultra Evolution. La validación del ensayo se hizo con 5 diferentes inhibidores de pared celular: caspofungina, compuesto A, compuesto B, ascosteroside y arundifungina. Estos compuestos fueron disueltos en agua o DMSO para hacer las diluciones seriadas. Las condiciones óptimas del ensayo se obtuvieron evaluando una serie de variables: sonicación de la suspensión de esporas, distintas concentraciones de esporas y diferentes tiempos de incubación.

**Resultados:** En este trabajo, presentamos un método espectrofotométrico para determinar automáticamente la susceptibilidad de *A. fumigatus* a β-(1,3)-D-glucano sintasa inhibidores usando un ensayo líquido que permite integrarlo en el programa de Productos Naturales con el resto de ensayos antimicrobianos validados en el mismo formato.

Las DO600 obtenidas en el ensayo, a distintas concentraciones de DMSO, fueron entre 0,24-0,25 a 40h de incubación y entre 0,34-0,68 a 64h. La robustez del ensayo se midió aplicando el coeficiente  $Z'$ , cuyos valores estuvieron entre 0,54 y 0,64. La variación entre placas fue muy aceptable, con coeficientes de variación por debajo de 12%. El DMSO tolerado por el ensayo fue igual ó menor del 5%. La sonicación de la suspensión de esporas tuvo un efecto positivo en reducir la variabilidad intraplaca. El solvente utilizado para la solución de los compuestos ha sido también fundamental ya que cuando se utiliza agua y no DMSO, la concentración necesaria para obtener un 70% de inhibición es mas alta en todos los compuestos utilizados, excepto para la caspofungina. Las mejores condiciones del ensayo fueron observadas a  $1 \times 10^4$  esporas/ml, 2,5% de DMSO y 40 h de incubación a 37°C. Los puntos de corte se establecieron en el 70% de inhibición, mostrando una buena correlación con las CME publicadas para los compuestos estudiados.

**Conclusiones:** Para evaluar la susceptibilidad de *A. fumigatus* a agentes antifúngicos incluyendo los inhibidores de la pared celular, se ha automatizado un método rápido y económico en medio líquido. La sonicación de las esporas ha sido un factor determinante en la homogeneidad de los resultados.

## 493

### EVALUACIÓN DEL MÉTODO E-TEST PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE ASPERGILLUS SPP. FRENTE A ANIDULAFUNGINA

A.I. Martos, A. González, M.C. Serrano, A. Romero, J. Pemán<sup>1</sup>, E. Cantón<sup>1</sup> y E. Martín-Mazuelos

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, H.U. La Fe. Valencia.  
U.G.C. Microbiología, H.U. Valme, Sevilla.

**Objetivo:** Estudiar la utilidad del método E-Test® (ET) para determinar la sensibilidad "in vitro" de *Aspergillus* spp. frente a anidulafungina (AND), comparándolo con el método de referencia: microdilución (MD) en caldo.

**Material y métodos:** Ensayamos 55 cepas de *Aspergillus* spp. aisladas de muestras clínicas: 21 *A. fumigatus*, 16 *A. flavus*, 15 *A. terreus*, 2 *A. niger*, 1 *A. glaucus*. La MD se realizó siguiendo las normas del CLSI (documento M38-A), con un rango de diluciones entre 0,003-16 µg/ml y leímos las CMEs (concentración mínima efectiva) a las 48 horas de incubación. Para el método ET (AB Biodisk, Solna Suecia) utilizamos medio RPMI 1640 con MOPS y 2% de glucosa, siendo el rango de concentraciones para AND 0,002-32 µg/ml, incubamos a 35°C e hicimos lecturas de las CMI (ignorando las microcolonias crecidas en el interior de la elipse) a las 24 y 48 horas. Incluimos en el estudio las cepas patrones: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304; y cepas control de calidad: *C. parapsilosis* 22019 y *C. krusei* 6258.

**Resultados:** El rango, CME50 y CME90 mediante MD para todos los *Aspergillus* ensayados fue  $\leq 0,003$  µg/ml (no determinándose CME50, CME90, CMI50 y CMI90 para *A. niger* ni *A. glaucus* por el bajo número de cepas). El rango, CMI50 y CMI90 mediante ET a las 24 y 48 horas para todas las especies fue  $\leq 0,002$  µg/ml; excepto para 3 cepas (2 *A. fumigatus* y 1 *A. terreus*) que a las 48 horas obtuvieron una CMI de 0,003 µg/ml. Tres cepas (5,5%) no crecieron a las 24 horas (1 *A. fumigatus* y 2 *A. terreus*). La correlación entre los dos métodos fue del 100% (CMEs y CMIs iguales  $\pm$  2 diluciones) tanto a las 24 como a las 48 horas.

**Conclusiones:** 1. El método de E-Test® puede ser una buena alternativa al de referencia para la determinación de la sensibilidad "in vitro" de *Aspergillus* frente a anidulafungina; aunque serían necesarios más estudios con cepas que presenten valores altos de CMI a esta equinocandina. 2. La lectura de ET para la mayoría de cepas puede realizarse a las 24 horas.

## 494

### EFFECTO DE TRES ANTIBIÓTICOS SOBRE EL METABOLISMO Y LA VIABILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PRODUCTOR DE BIOPELÍCULAS

M.T. Martín, P.M. López, N. Fernández-Hidalgo, J. Gavalda, X. Gomis y A. Pahissa

Laboratorio de Investigación, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

**Introducción:** La formación de biopelículas (BP) por *Staphylococcus aureus* (SA) sobre materiales sintéticos representa un importante problema. Las bacterias que crecen en BP son más resistentes a los antibióticos; no se conoce con exactitud su comportamiento frente a los antibióticos en estas condiciones. Se investigó el efecto in vitro de linezolid (LNZ), gentamicina (GEN) y ciprofloxacino (CIP) sobre la actividad metabólica mediante el indicador redox resazurina (RZ) y sobre la viabilidad mediante recuento de UFC de una cepa de SA sensible a meticilina productora de BP.

**Métodos:** Se inocularon baterías de tubos de poliestireno con 1 mL de una suspensión ( $10^6$  cel/mL) de SA en caldo TSB+ 0,5% glucosa y se incubaron 24 h (37°C, atmósfera ambiente). Las BP generadas se lavaron con PBS y suero fisiológico (SF) y se añadió 1 mL de Mueller-Hinton con concentraciones (rango 0,125-2048 mg/L) de LNZ, GEN o CIP. Las baterías incluyeron controles de crecimiento (BP sin antibiótico; CC-) y esterilidad (sólo medio de cultivo). Tras incubación (24 h, 37°C, atmósfera ambiente) se lavaron los tubos con PBS y SF y se rellenaron con 1 mL de TSB+0,0015% RZ. Tras incubación (37°C, 165 min) se extrajeron alícuotas de cada tubo para lectura fluorométrica de la RZ (530/590 nm excit/emis). Los tubos se lavaron con SF y se sonicaron (50 Hz, 10 min). Se efectuaron diluciones decimales del sonificado y se sembraron en TSA+5% sangre para recuento de UFC viables. Se calculó el porcentaje de fluorescencia de los tubos con antibiótico respecto al CC y se calculó el log de las ufc recuperadas de cada tubo. Los resultados se analizaron mediante ANOVA. Se consideró significativa una  $P \leq 0,05$ . Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Resultados:** Se produjo una reducción significativa de la actividad metabólica/log ufc con respecto al CC con las siguientes concentraciones: LNZ 1 / 128; GEN 1 / 32; CIP 0,125 / 0,125. El porcentaje de actividad metabólica/log ufc se redujo de media en un 83,8 / 2,0 (LNZ), 88,9 / 3,2 (GEN) y 87,2 / 2,8 (CIP) respecto al CC.

**Conclusión:** Bajo las condiciones utilizadas, los antibióticos estudiados redujeron significativamente la actividad metabólica bacteriana y el número de ufc sin conseguir la erradicación de bacterias viables en la BP. La reducción de la actividad metabólica se consiguió con concentraciones menores que las necesitadas para lograr una letalidad significativa en el caso de LNZ y GEN y a la misma concentración de las estudiadas en el caso de CIP. La disminución de actividad metabólica no fue sinónimo de falta de viabilidad. Son necesarios más estudios para determinar el alcance de estos resultados.

## 495

### ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LINEZOLID, VANCOMICINA, GENTAMICINA Y CIPROFLOXACINO FRENTE A BIOFILMS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS MEDIANTE LOS INDICADORES METABÓLICOS XTT Y RESAZURINA (RZ).

N. Fernández-Hidalgo, M.T. Martín, P. López, X. Gomis, J. Gavalda, B. Almirante y A. Pahissa

Laboratorio de Investigación, Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

**Introducción:** Los biofilms (BF) de *Staphylococcus aureus* (SA) muestran sensibilidad reducida a los antibióticos. Se

evaluó la actividad de linezolid (LNZ), vancomicina (VAN), gentamicina (GEN) y ciprofloxacino (CIP) frente a BF de SA mediante el uso de la sal de tetrazolio XTT y la RZ como indicador de óxido-reducción

**Métodos:** Se estudiaron 10 cepas de SA resistentes a metilicina y quinolonas (SARM) y 7 cepas de SA sensibles a metilicina (SASM) recuperadas de pacientes con bacteriemia de origen en catéter. Los BF se obtuvieron en filas de placas de microtitulación de fondo plano, inoculadas con  $10^6$  ufc/mL en caldo TSB. Para cada cepa se incluyeron un control de crecimiento (CC) y un control de esterilidad (CE). Las placas se incubaron 24h a 37°C y fueron lavadas y rellenadas con caldo Mueller-Hinton que contenía las diluciones de LNZ, VAN, CIP, y GEN con un intervalo de concentraciones de 2048 a 0,125 mg/L. Tras incubación de 24h a 37°C las placas se lavaron y se añadió TSB con 0,2 mg/L de XTT + menadiona 0,1 µM o con 0,0015% de RZ. Las placas se incubaron 2h y 45 min a 37°C, y se leyó la absorbancia del XTT a 492 nm y la fluorescencia de la RZ (530/590 nm excitación/emisión). A los valores obtenidos en los pocillos con BF se les restó el valor de los CE. Se calculó el % de actividad metabólica (AM) de los BF expuestos a antibióticos respecto a sus respectivos CC. Se consideraron aquellas concentraciones (mg/L) que inhibían >75 y >90% (CI75, CI90) de la AM; el test de ANOVA se usó para comparar el  $\log_{10}$  de CI75 y 90. Los estudios se hicieron por triplicado.

**Resultados:** El XTT y la RZ mostraron resultados similares. En los SAMS, la media geométrica de la CI90 fue 4,9 mg/L para VAN, 9 mg/L para GEN, 2,3 mg/L para CIP y 50 mg/L para LNZ. En los SARM, la media geométrica de la CI90 fue de 8 mg/L para VAN, 157,6 para GEN y 1024 para LNZ. Solo CIP a 2048 mg/L inhibió al 100% la AM. En SAMS el  $\log_{10}$  CI90 de VAN, GEN y CIP fue significativamente menor que el de LNZ ( $p < .05$ ). En los SAMR, el  $\log_{10}$  CI90 de VAN fue significativamente menor que el de GEN ( $p < .01$ ) y el  $\log_{10}$  CI90 de VAN y GEN mostraron diferencia significativa respecto a LNZ ( $p < .021$ ).

**Conclusión:** El XTT y la RZ se comportaron de una manera similar para detectar la actividad de LNZ, VAN, GEN, y CIP frente a BF de SA. Para las dos categorías de SA, LNZ mostró un  $\log_{10}$  CI90 significativamente superior a los otros antibióticos. La mayor reducción de AM se consiguió tras exposición de los BF a concentraciones elevadas de CIP.

## 496

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ANFOTERICINA B (AB) FRENTE A BIOFILMS DE CANDIDA ALBICANS, CANDIDA PARAPSILOSIS, CANDIDA GLABRATA Y CANDIDA TROPICALIS MEDIANTE DETERMINACIÓN FLUOROMÉTRICA CON CFDA

P.M. López, M.T. Martín, J. Gavalda, N. Fernández-Hidalgo, X. Gomis y A. Pahissa

Laboratorio de Investigación, Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.

**Objetivo:** Los biofilms (BF) de Candida suponen un problema tanto para los estudios de sensibilidad antifúngica como para el tratamiento de infecciones por Candida sobre materiales artificiales. En este estudio se evaluó la sensibilidad de biofilms de *Candida albicans* (CA), *C. parapsilosis* (CP), *C. albicans* (CG), y *C. tropicalis* (CT) frente a AB mediante la fluorescencia de células vivas teñidas con diacetato (6)-carboxifluoresceína (CFDA).

**Métodos:** Se estudiaron cepas de Candida (12 CA, 5 CP, 4 CG y 2 CT) productoras de BF aisladas de pacientes con candidemia.

Para producir el BF se inocularon placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con 0,2 mL de una suspensión de levaduras 2 McFarland en Medio Antibiótico # 3 (AM3) + 8% Glucosa y se incubaron a 35° C durante 24 h. Para cada cepa se incluyó un pocillo de control de esterilidad. Tras la incubación los BF se lavaron con PBS y solución salina fisiológica (SF) estériles y se rellenaron los pocillos con 0,2 mL de AM3 que contenían concentraciones de AB de 0,25 a 128 mg/L; para todas las cepas se rellenó un pocillo con AM3 sin AB (control de vitalidad -CV-). Tras incubarlas (24 h, 35°C) las placas se lavaron con MOPS pH 3 estéril y a los pocillos se les añadió 0,2 mL de 50 mg/L de CFDA en MOPS 3. Las placas se incubaron 30 min a 35°C, se lavaron y se llenaron con MOPS 3 y se midió la fluorescencia de los pocillos (excitación/emisión 492/520 nm). Se calculó el % de fluorescencia (%F) de los pocillos con BF expuesto a AB en relación al CV. Se consideraron activas las concentraciones que redujeron el %F > 80%. Los estudios se realizaron por triplicado.

**Resultados:** La media geométrica (MG) de concentraciones de AB que consiguieron una reducción del %F > 80% fueron para CA, CP, CG, y CT de 2,67, 0,57, 0,59 y 1 mg/L respectivamente. Se consiguió una reducción > 99% F de células vivas con concentraciones (MG) de AB de 14,25, 5,28, 1,56 y 8 mg/L para CA, CP, CG, y CT respectivamente.

**Conclusión:** La determinación fluorométrica de la vitalidad de BF de Candida mediante el CFDA es útil para evaluar la actividad de AB frente a biofilms. La AB muestra una mayor actividad frente a los biofilms de CP, CG y CT que frente a los de CA. Son necesarios nuevos estudios que profundicen en la utilidad del CFDA y otras técnicas de viabilidad celular, en los estudios de sensibilidad a los antifúngicos de los BF de Candida.

## 497

### LECTURA INTERPRETADA DEL ANTIBIOGRAMA DE ESCHERICHIA COLI Y KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORES DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EL LABORATORIOS ESPAÑOLES.

M.C. Conejo<sup>1</sup>, C. Mata<sup>2</sup>, F. Navarro<sup>2</sup>, A. Pascual<sup>1,3</sup>, GEMARA y Control de Calidad SEIMC.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Servicio de Microbiología, <sup>2</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona, <sup>3</sup>Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla

**Objetivos:** Analizar cómo se realiza en los laboratorios de Microbiología españoles la lectura interpretada del antibiograma en aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

**Material y métodos:** Se enviaron 7 cepas productoras de BLEE bien caracterizadas y dos cepas controles (ATCC25922 y ATCC35218) a 57 laboratorios repartidos por toda la geografía nacional. De las 7 cepas productoras de BLEE, 6 correspondían a aislados clínicos productores de las BLEE más prevalentes en nuestro país (2 CTX-M-10, 1 CTX-M-9, 1 CTX-M-14, 1 TEM-4 y 1 SHV-12) y la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (productora de SHV-18). Se les pidió que aplicasen los métodos que utilizarían rutinariamente para la identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana, considerando las cepas como aislados de hemocultivos. Todos los participantes tenían que suministrar los resultados de la identificación y el antibiograma (tanto cuantitativos como cualitativos, en categorías clínicas de acuerdo al valor de CIM o diámetro de halo y categorías clínicas interpretadas en función del fenotipo de resistencia detectado). Los participantes también tenían que suministrar información sobre los métodos utilizados (es decir, tipo de sistema automático o manual).

**Resultados:** El 61% de los centros utilizó sistemas automatizados para la identificación y estudio de la sensibilidad antimicrobiana. El 39% restante utilizó sistemas semiautomatizados o manuales. La identificación bacteriana a nivel de especie fue correcta en el 99% de los casos. El 91% de los laboratorios (52 de los 57) identificó correctamente la producción de BLEE en todas las cepas enviadas, quedando sólo 5 centros que fallaron al identificar alguna de las cepas pro-

ductoras de BLEE. La identificación del fenotipo BLEE se acompañó siempre del cambio de categoría clínica a resistente para todas las cefalosporinas y el aztreonam, excepto en el caso de un laboratorio que no modificaba la del aztreonam. La identificación del fenotipo BLEE en muchos casos llevó a modificar las categorías clínicas de las combinaciones de penicilina/inhibidor de beta-lactamasas: Así, en el caso de amoxicilina/ácido clavulánico el 45% de los centros modificó la categoría clínica. Por lo que se refiere a piperacilina/tazobactam el 39% de los centros modificó la categoría clínica. La modificación más frecuente fue de sensible a resistente (30% en el caso de amoxicilina/ácido clavulánico y 26% en el caso de piperacilina/tazobactam).

**Conclusiones:** Los laboratorios de Microbiología identifican de forma fiable las BLEEs más prevalentes en España en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* y realizan de forma correcta la lectura interpretada del antibiograma para las cefalosporinas y el aztreonam. No existen criterios uniformes sobre cómo informar las combinaciones de penicilina/inhibidor de beta-lactamasas.

## 498

### DISEÑO DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP. RESISTENTES A ERITROMICINA

C. Simón-Baamonde, D. Pérez-Boto, J. A. López-Portolés y M.A. Echeita

Laboratorio de *Campylobacter*, *Yersinia* y *Vibrio*. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

**Introducción:** *Campylobacter jejuni* y *C. coli* han sido reconocidos en los países desarrollados como la principal causa de gastroenteritis bacteriana. En los casos de campilobacteriosis severas, la Eritromicina es el tratamiento de elección. El objetivo de este estudio fue diseñar una PCR múltiple para la detección de la principal mutación (A2059G) presente en el gen 23S ARNr, que ha sido asociada con altos niveles de resistencia a Eritromicina en *Campylobacter* spp.

**Material y métodos:** Se estudiaron 58 (7,2%) cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a Eritromicina, del total de 808 cepas recibidas entre 2006 y 2007 en el Laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII), procedentes de diferentes hospitales españoles. 23 cepas fueron identificadas como *C. jejuni* y 35 como *C. coli*. La CMI de las cepas osciló entre 8 y > 256 µg/ml. Se diseñó una PCR múltiple para la detección de la mutación (A2059G) que amplificaba un fragmento del gen 23S ARNr de 442 pb en todas las cepas y otro de 244 pb sólo en aquellas que presentaban la mutación. Con el fin de confirmar estos resultados, en una selección de cepas sensibles y resistentes, un fragmento de 850 pb del gen, que incluía la zona de la mutación, fue amplificado y posteriormente digerido usando la enzima BsaI, que reconoce y digiere la secuencia mutada.

**Resultados:** Un alto porcentaje de las cepas con una CMI > 256 µg/ml a Eritromicina pertenecían a la especie *C. coli* (81,8%). Ninguna de las cepas (n = 21) con CMIs entre 8 y 256 µg/ml presentaron la mutación A2059G y no amplificaron el fragmento de 244 pb en la PCR múltiple. En la mayoría de las cepas con CMI > 256 µg/ml a Eritromicina, se identificó la mutación. Esto fue confirmado mediante restricción del gen 23S ARNr usando la enzima BsaI.

**Conclusiones:** Es destacable señalar que las cepas con altos niveles de resistencia a Eritromicina, antibiótico de elección en las campilobacteriosis severas, pertenecían mayoritariamente a la especie *C. coli* y dentro de ésta, únicamente el 22,9% presentaron resistencia < 256 µg/ml. Como han descrito otros autores, en nuestro estudio se confirmó que la mutación (A2059G) en el gen 23S ARNs confiere niveles de resistencia a Eritromicina superiores a 256 µg/ml. La PCR múltiple diseñada proporcionó un método sencillo y reproducible para la detección de dicha mutación en *C. jejuni* y *C. coli*.

## 499

### EVALUACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO CICA-BETA-TEST (KANTO CHEMICAL®) PARA LA DETECCIÓN DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), METALO-BETA-LACTAMASAS Y AMPC

M.D. Quesada<sup>1</sup>, M. Giménez<sup>1</sup>, S. Molinos<sup>1</sup>, G. Banqué<sup>1</sup>, E. Miró<sup>2</sup>, A. Ramírez<sup>1</sup> y V. Ausina<sup>1</sup>

Servicio de Microbiología, <sup>1</sup>Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, <sup>2</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

**Objetivo:** Evaluación de un nuevo método, Cica-Beta-Test (Kanto Chemical Co. Inc, Japan; Mast, UK), para detección rápida de BLEE, metalo-β-lactamasas y AmpC a partir de aislamientos de bacilos gramnegativos.

**Material y métodos:** Se estudiaron una colección de 87 cepas aisladas de diversas muestras clínicas, se incluyeron tanto enterobacterias como *P. aeruginosa*. Del total de cepas, 62 (71,2%) presentaban alguno de los siguientes mecanismos de resistencia: BLEE 49 (79%), AmpC 6 (9,6%), metalo-β-lactamasas 3 (4,8%), mecanismo múltiple 4 (6,4%), y 25 (28,7%) no presentaba ninguno. Todas las cepas fueron caracterizadas por métodos fenotípicos y el 72% también genotípicamente. El antibiograma se realizó mediante técnica de disco-difusión y los resultados se interpretaron según criterios establecidos por el CLSI. Todas las cepas fueron retestadas con el Cica-Beta-Test (método cromogénico con una cefalosporina HMRZ-86 de sustrato) a partir de los aislamientos obtenidos en la placa de Mueller-Hinton, y siempre alrededor del halo de inhibición del disco de una cefalosporina de tercera generación. La lectura se realizó a los 15 minutos. Se calcularon los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) tomando la caracterización fenotípica y/o genotípica como referencia.

**Resultados:** Cica-Beta-Test coincidió con el método de referencia en el resultado final de 82 (94,2%) de las cepas, mientras que en 5 (5,8%) el resultado fue discordante. De las 62 cepas que presentaban algún mecanismo de resistencia, el Cica-Beta-Test dio positivo en 57, y las 25 cepas que no presentaban ningún mecanismo de resistencia dieron resultado negativo. Cica-Beta Test presenta una S de 91,93% y una E del 100%. De las 5 cepas discordantes, dos eran AmpC caracterizadas genotípicamente y el test dio como resultado BLEE y mecanismo múltiple. Dos cepas productoras únicamente de BLEE (TEM-7 y CTX-M-3), fueron detectadas como mecanismo múltiple en el test y en una cepa con mecanismo de resistencia múltiple (CTX-M-15 más VIM-1) solo se detectó la BLEE.

**Conclusiones:** 1. Cica-Beta-Test es un método de screening sencillo y rápido para detección de beta-lactamasas de espectro extendido. El test es útil como confirmatorio de la prueba de sinergia en disco en casos dudosos y para la detección de BLEE cuando se asocian varios mecanismos de resistencia. 2. La posibilidad de detección de múltiples mecanismos de resistencia en un solo ensayo es una herramienta muy útil en la rutina diaria del laboratorio.

## 500

### EVALUACIÓN DE LA TARJETA AST-P559 VITEK-2 PARA DETECTAR RESISTENCIA A OXACILINA EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

E. Torres<sup>1\*</sup>, S. Pérez<sup>2</sup>, R. Villanueva<sup>1</sup> y G. Bou<sup>1</sup>

Servicio de Microbiología, <sup>1</sup>Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, La Coruña; <sup>2</sup> Hospital Meixoeiro, Vigo, Spain.

**Introducción:** Las infecciones invasoras por SARM se asocian con mayor mortalidad y coste económico que las causadas por *Staphylococcus aureus* sensible. En España, diversos estudios de prevalencia multicéntricos han mostrado aumentos en el porcentaje de resistencia a meticilina entre los aislamientos de *S. aureus* a lo largo de los años 90, hasta al-

canzar cifras superiores al 30% desde principios de la década actual. La necesidad de una respuesta rápida y específica por parte de los laboratorios de Microbiología, se hace evidente y necesaria, tanto para el aislamiento de los pacientes infectados/colonizados por MRSA, como para el tratamiento de los mismos.

**Objetivo:** Evaluar la nueva tarjeta AST-P559 para *Staphylococcus* spp en el sistema automatizado VITEK-2 (bioMérieux) en la detección de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA).

**Material y métodos:** 1) 301 cepas de *Staphylococcus aureus* (51 cepas gen mecA(-) y 250 gen mecA(+)), recogidas de 7 hospitales del noroeste de España. Cepas control de *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 29523, sensibles a oxacilina y gen mecA(-). 2) Tarjetas AST-P559 (bioMérieux) en las que la interpretación final de la oxacilina (OXA) está basada en el resultado del screening de cefoxitina (CFX) y la lectura de la CMI de oxacilina (CMI = 0,25-4 µg/ml). La interpretación del screening con CFX como punto final es a las 4 horas y la interpretación final de la tarjeta es a las 12 horas. 3) PCR del gen mecA. 4) Tipado spa y agrupación en complejos clonales.

**Resultados:** 1) 30 diferentes tipos de spa, siendo los más prevalentes: t02: 23,6%, t67: 17,6%, t12: 16,3% y t18: 22%. 2) 51 cepas sensibles a OXA y CFX y mecA(-), fueron clasificadas como *S. aureus* sensibles a meticilina por el sistema evaluado, 3) 250 cepas resistentes y mecA(+): 247 cepas fueron resistentes a OXA y CFX y clasificadas como MRSA por el sistema evaluado, 4) las 3 cepas discrepantes, tras selección de la población heterorresistente en placas de CROMAGAR MRSA (Becton & Dickinson) fueron reevaluadas y se reclasificaron como MRSA.

El screening de CFX mediante las tarjetas AST-P559 tiene una sensibilidad (S) = 98,8%, una especificidad (E) = 100% y un valor predictivo positivo (VPP) = 1 y valor predictivo negativo (VPN) = 0,94.

**Conclusión:** Como se ha descrito la CFX es un buen marcador de la resistencia a metilicina. Las tarjetas AST-559 con una lectura para la CFX a las 4 horas, puede considerarse un método rápido y eficaz para la detección de MRSA con un VPP = 1.

## 501

### POSACONAZOL: ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE ORGANISMOS LEVADURIFORMES MEDIANTE DOS MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN

M.J. Linares, F. Solís, M. Causse y M. Casal

Microbiología, Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

**Objetivos:** Se ha detectado la actividad in vitro del posaconazol (POS) por dos métodos de microdilución: El método de referencia (CLSI, documento M27-A2) (MR) y el método comercializado y colorimétrico Sensititre YeastOne® (SYO).

**Material y métodos:** Se ensayaron un total de 295 cepas de las cuales: 124 *Candida albicans* (69 sensibles a fluconazol (FLZ), 15 sensible dependiente de la dosis y 40 resistentes a FLZ), 82 *C. parapsilosis*, 25 *C. tropicalis*, 22 *C. albicans*, 13 *Trichosporon mucoides*, 6 *C. famata*, 6 *Cryptococcus albidus*, 4 *C. sake*, 3 *C. krusei*, 2 *C. catenulata*, 2 *C. lusitanae*, 2 *C. rugosa*, 2 *Rhodotorula glutinis*, 1 *C. kerfy*, 1 *Ceotrichum candidum* aisladas de diferentes muestras clínicas. La sensibilidad al POS se determinó por los dos métodos antes mencionados. Las CMIs por los dos métodos fueron determinadas a las 24 horas de incubación a 35° C. La CMI para el MR fue definida como la menor concentración de antifúngico que produjo una inhibición del crecimiento del 80%, para el SYO se siguieron las instrucciones del fabricante. El rango de concentración ensayadas de POS fue de 0,008 -16 mg/l. Como control de calidad, en cada ensayo, se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

**Resultados:** La CMI 50/90 expresado en µg/ml, por el MR para las especies mas representadas fue: *C. albicans* Sensible a FLZ y SDD: 0,03/0,03; Resistente a FLZ: 0,06/0,5; *C. parapsilosis*: 0,03/0,06; *C. tropicalis*: 0,03/0,125; *C. albicans*: 2/2; Tr. mucoides: 0,5/0,5; *C. sake*: 0,03/0,03; *C. krusei*: 0,25/0,5. La CMI 50/90 expresado en µg/ml, por el SYO para las mismas especies fue: *C. albicans* Sensible a FLZ y SDD: 0,03/0,06; resistente a FLZ: 0,06/1; *C. parapsilosis*: 0,03/0,03; *C. tropicalis*: 0,03/0,5; *C. albicans*: 1/2; Tr. mucoides: 0,25/0,5; *C. sake*: 0,03/0,03; *C. krusei*: 0,03/0,06. Los porcentajes de correlación: método de referencia/ método comercializado  $\pm 2$  diluciones oscilaron entre 94 - 100%. Cuatro cepas de *C. tropicalis*, tres cepas de *C. albicans* y dos de *C. albicans* manifestaron una CMI  $\geq 4$  mg/l por los dos métodos.

**Conclusiones:** Los resultados demuestran que existe una elevada concordancia entre los métodos estudiados, la facilidad en la realización y lectura por el método comercializado, nos podría sugerir la utilidad de este método para determinar la sensibilidad a posaconazol de los organismos levaduriformes aislados de muestras clínicas. No obstante, se necesitan más estudios con mayor número de cepas resistentes para determinar su capacidad de identificarlas.

## 502

### “EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE CANDIDA SPP FRENTE A VORICONAZOL MEDIANTE LA TARJETA AST-YS01 DEL SISTEMA VITEK-2 VS MÉTODO DE REFERENCIA M27-A2”

A. González, A. Romero, T. González, A.I. Aller, C. Castro, E. Cantón<sup>1</sup>, J. Pemán<sup>1</sup> y E. Martín-Mazuelos

<sup>1</sup>Hospital La Fe. Valencia, Hospital de Valme. Sevilla.

**Objetivos:** Comparar la tarjeta AST-YS01 del sistema comercial automatizado VITEK 2 (bioMérieux S.A.) con el método de referencia CLSI M27-A2 (microdilución) para el estudio de la sensibilidad “in vitro” de *Candida* spp frente a voriconazol.

**Material y métodos:** Se estudiaron 182 aislamientos de *Candida* spp (97 *C. albicans*, 27 *C. albicans*, 15 *C. krusei*, 21 *C. tropicalis*, 8 *C. parapsilosis*, 7 *C. guilliermondii*, 7 *C. famata*) por el método de microdilución (MD) y mediante las tarjetas AST-YS01 del sistema VITEK 2 (bioMérieux S.A.). Para la MD se prepararon inóculos al 0,5 McFarland según las normas del documento M27- A2 del CLSI, haciendo la lectura de las CMIs a las 48 horas.

Para la determinación de las CMIs por el sistema VITEK 2 (bioMérieux S.A.) se siguieron las normas del fabricante.

Los puntos de corte se aplicaron según documento M27-A2 del CLSI. Se incluyeron como control de calidad las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Se consideró error muy grave un aislamiento R por la MD y S por VITEK-2; error grave S por MD y R por VITEK-2 y error leve SDD por uno de los métodos y R ó S por el otro.

Para cada especie se calculó el porcentaje de concordancia (+/- 2 diluciones) de las CMIs obtenidas por ambos métodos y la correlación por categoría clínica (CC), así como el porcentaje de cepas S, SDD y R y el porcentaje de errores.

**Resultados:** La concordancia media entre métodos fue del 84,42%; (100% en *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. famata*; 89,47% en *C. albicans*; 77,7% *C. albicans*; 71,40% en *C. guilliermondii* y 52,38% en *C. tropicalis*). La correlación por CC fue del 87%, (100% en *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. famata*; 93,68% en *C. albicans*; 81,5% *C. albicans*; 71,4% en *C. guilliermondii* y 61,9% en *C. tropicalis*).

La mayoría de los errores observados fueron leves (28,57% en *C. guilliermondii*; 11,11% en *C. albicans*; 4,76% en *C. tropicalis* y 1% en *C. albicans*), excepto en *C. albicans* y *C. tropicalis* con un 7,4 y 33,33% de errores muy graves respectivamente.

**Conclusiones:** 1) Existe una buena correlación entre el sistema VITEK-2 y el método de referencia para la mayoría de las especies de *Candida* estudiadas. 2) El VITEK-2 no detectó las 7 cepas resistentes de *C. tropicalis* y las 2 de *C. albicans* originando errores muy graves. 3) El sistema automatizado VITEK-2 permite determinar MICs en menos de 15 horas, agilizando el trabajo en el laboratorio y disminuyendo el tiempo de emisión de resultados.

## 503

### EVALUACIÓN DEL SISTEMA AUTOMATIZADO COBAS AMPLIPREP TNAI® EN LA EXTRACCIÓN DE DNA PARA LA DETECCIÓN DE VPH DE ALTO RIESGO EN MUESTRAS ENDOCERVICALES

M. Trigo\*, P. Álvarez\*, A. Pallarés\*, M.A. Pascual\*, V. Pulán\*, M. Hernández\*, C. Torres\*\* y M. García-Campello\*

\*Servicio de Microbiología \*\*Área de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento Cultura y Alimentación. \*Complejo Hospitalario de Pontevedra. \*\*Universidad de La Rioja.

**Introducción:** La inclusión de PCR en los nuevos protocolos de cribado de cáncer de cervix conlleva un aumento considerable en el número de muestras a procesar en el laboratorio de Microbiología. La laboriosidad y la probabilidad de contaminación de la extracción manual de DNA en estas muestras, hace necesaria la optimización de dicho proceso mediante sistemas automatizados de extracción.

**Objetivos:** Comparar los resultados de extracción de DNA en el sistema automatizado COBAS AmpliPrep-TNAI®(Roche) con la extracción manual de DNA, AMPLICOR AmpliLute®(Roche) recomendado para la detección HPV-AR con AmpliCor® HPV Test (Roche) en muestras endocervicales.

**Material y métodos:** Se estudiaron un total de 119 muestras. En la primera fase del estudio se comparó en 90 muestras la extracción manual (M) con la automatizada (A). Para la extracción A se utilizó COBAS AmpliPrep TNAI (Roche) modificando el buffer de elución. El volumen de extracto M para la PCR fue de 50 µl como indica el protocolo, y se tomaron 20 µl del extracto A (A20) para la PCR. A la vista de las sensibilidades obtenidas se continuó el estudio con una segunda fase en la que se analizaron 57 muestras y de nuevo se comparó la extracción M/A, pero tomando un volumen de entrada en PCR de 50 µl (A50). Se consideró resultado de referencia la presencia de HPV-AR en DNA extraído manualmente y confirmado con la presencia de genotipos de AR con el sistema Linear Array®HPV Genotyping Test (Roche).

**Resultados:** En la primera fase del estudio (extracción M vs extracción A20), el porcentaje de muestras positivas según la técnica de referencia fue del 11,1%. Los resultados fueron los siguientes: sensibilidad 100% vs 77,7%, especificidad 98,7% vs 98,7%. Valores DO betaglobina (control interno) superiores a 3: > 98%. El porcentaje de muestras positivas en la segunda fase del estudio (extracción M vs extracción A50) fue del 57,4%. Dentro de este grupo se incluyeron las dos muestras discordantes (+ M, - A20) responsables de la disminución de sensibilidad. Los resultados M vs extracción automática 50 µl (A50) fueron los siguientes: sensibilidad 100% vs 100%, especificidad 86,9% vs 95,8%. Muestras con valores DO betaglobina (control interno) superiores a 3, 95% (M) y 69,5% (A). Muestras con valores de DO betaglobina inferior a 1, 4,3%.

**Conclusiones:** La extracción automática presenta una buena correlación con la manual cuando el volumen de DNA de entrada es 50 µl. Como contrapartida se da una disminución de eficacia de la PCR constatado por una disminución generalizada de la DO del control interno. Cuando se estudian muestras con un alto % de positividad (M vs A50), la especificidad de la extracción manual es inferior a la automática al ser este proceso menos susceptible a contaminaciones.

## 504

### EVALUACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE DIFUSIÓN DISCO PLACA PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE HONGOS FILAMENTOSOS NO ASPERGILLUS A TRES ANTIFÚNGICOS (ANFOTERICINA B, ITRACONAZOL Y POSACONAZOL)

C. Martín de la Escalera,<sup>1</sup> E. López-Oviedo<sup>1</sup>, A. Romero<sup>1</sup>, A.I. Aller,<sup>1</sup> A.I. Martos<sup>1</sup>, E. Cantón<sup>2</sup>, J. Pemán<sup>2</sup>, P. García-Martos<sup>3</sup> y E. Martín Mazuelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de gestión de Microbiología Hospital Universitario de Valme. Sevilla. <sup>2</sup>Unidad de gestión de Microbiología Hospital La Fe. Valencia. <sup>3</sup>Unidad de gestión de Microbiología Hospital Puerta del Mar. Cádiz.

**Objetivo:** Ver la actividad in vitro de AnfotericinaB (B), Itraconazol(It) y Posaconazol (P) por difusión disco placa(d/p) en el medio Mueller-Hinton (M-H) en cepas de hongos filamentosos no *Aspergillus* y compararla con el método de referencia, microdilución(MD) en caldo (CLSI M38-A).

**Material y método:** Estudiamos 50 cepas: 20 Dematiaceos (D) (8 *S. apiospermum*, 5 *S. prolificans*, 1 *Rhinocladiella* spp, 1 *Curvularia* spp, 1 *H. werneckii*, 1 *Bipolaris* sp, 1 *Phialophora* spp, 1 *Phoma* sp, 1 *Stachybotrys* spp), 14 *Zigomycetos* (Z) (5 *Rhizopus* spp, 3 *Mucor* spp, 1 *M. miemalis*, 1 *M. ramosissimus*, 1 *C. bertholletiae*, 1 *Absidia* spp, 1 *Syncephalastrum* spp) y 16 *Hiphomicetos* hialinos (HH) (5 *Fusarium* spp, 2 *F. solani*, 1 *F. clamydosporum*, 1 *F. dimerum* 1 *F. solbelutiaris* 2 *S. fisco*, 1 *Paecilomyces* spp, 1 *Verticillium* spp, 1 *Trichoderma* spp, 1 *Artrografis* spp). La sensibilidad por MD (según CLSI M38-A) y la lectura de la CMI fue: 24 h para Z y 24-48 h el resto. D/p con tabletas de B (10 µg) e It (10 µg) (Neo Sensitabs) y discos de P (5 µg) (Abtek Biologicals Ltd. Liverpool, U.K.). Leímos el halo de inhibición (IZ en mm) a las 24 h Z y 24-48 h el resto, en el punto donde hubo inhibición total del crecimiento. Los puntos de corte (PC) arbitrario (Espinell-Ingroff A.J. Clin. Microbiol. 2007;45) para MD: Sensible (S) ≤ 1 µg/ml, Intermedio(I) = 2 µg/ml y Resistente(R) ≥ 4 µg/ml a todos los antifúngicos(AF) y para d/p: S ≥ 17 mm It y P y ≥ 15 mm B; I 14-16 mm It y P y 13-14 mm B, R ≤ 13 mm It y P y ≤ 12 mm B. Calculamos la correlación (IC) de los métodos para las 50 cepas con los 3AF según dichos PC. Expresamos también los resultados entre los métodos en errores menores: entre S y dosis dependiente (SDD) ó SDD y R, errores mayores: MD S y d/p R, errores muy mayores: MD R y d/p S. Cepas patrones *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304.

**Resultados:** tabla.1. IC de los IZ (d/p) con las CMI (MD CLSI M38-A) por categorías clínicas (CC); S, I, R para los 50 aislamientos de hongos filamentosos no *Aspergillus* y los 3 AF estudiados

AF	% correlación CC			% de error			Correlación %
	S	I	R	Menor	Mayor	Muy mayor	
B	75	4	21	4	14	0	72
MIC	67	3	30				
D/p							
It	73	0	27	4	14	10*	75
MIC	78	4	18				
D/p							
P	96	0	4	10	22	2**	70
MIC	62	21	17				
D/p							

\* *Paecilomyces* spp, *Trichoderma* spp *Scopulariopsis fisco*, *Hortaea werneckii*. \*\* *Paecilomyces* spp

**Conclusiones:** 1. El método d/p es fácil pero no detecta R en algunas especies, mas al no existir PC, la relevancia clínica de estos resultados in vitro están por definir. 2. Los errores muy mayores se vieron en HH, 1D y los azoles. 3. D/p no diferenció valores S, I y R para algunas combinaciones de AF- hongo.