

la prevalencia de este problema, analizar las causas de la replicación de bajo nivel (RBN) y determinar si los clínicos modifican el tratamiento en estos pacientes.

Material y métodos: Diseño de cohorte retrospectivo. Se analizaron todos los pacientes desde septiembre del 2007 hasta enero del 2009 que habían recibido TARGA durante todo ese tiempo nuestro Hospital y que habían logrado una CV < 40 copias/ml. Se definió una RBN como la detección de una carga viral > 40 copias y menor de 1.000 copias/ml en dos determinaciones consecutivas. Se estudió el tipo de TARGA y el porcentaje de adherencia según la dispensación del Servicio de Farmacia en todos los pacientes.

Resultados: Se estudiaron 151 pacientes con una mediana de edad 44 años (IIQ: 40-48 años) siendo el 68% varones. Tras un seguimiento de entre 1 y 1 año y 4 meses, el 33% de los pacientes presentaron una RBN. El 41, 27, 26 y 6% de los pacientes con RBN habían recibido un primer, segundo, tercero o más de tres TARGA. El 59% recibía 2 análogos de nucleósidos (AN) y un no análogo (NN) y el 39% dos AN más un inhibidor de proteasa (IP) y el resto otras pautas. La mediana de tiempo entre que el paciente se encontraba con CV indetectable hasta que presentaba dos determinaciones consecutivas de baja replicación viral fue de 8,6 meses (IIQ: 7-10 meses). La mediana de CV fue de: 146 copias (IIQ: 77-244 copias/ml). Tras una mediana de 8,6 meses de seguimiento la mediana de incremento de linfocitos CD4 fue de 40 cel/ml (IIQ: -60 a +140 linfocitos CD4/ml). El 90% de los pacientes tenían un 95% o más de adherencia. Tras la detección de la RBN, el TARGA se modificó en el 26,6% de las ocasiones. El 17% de los pacientes con NN modificaban el TARGA tras la detección de la RBN frente a un 43% de los pacientes con IP ($p = 0,071$).

Conclusiones: La RBN es un problema frecuente en nuestras consultas a pesar de una adherencia satisfactoria. La mayoría de los clínicos no modifican el TARGA. Persiste un incremento leve aunque clínicamente significativo de los linfocitos CD4 a pesar de la replicación viral. Existe una tendencia a modificar el TARGA cuando los pacientes toman IP en lugar de NN.

Sesión 18:

Hongos

257. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A VORICONAZOL DE CEPAS CLÍNICAS DE CANDIDA spp. EVOLUCIÓN A LO LARGO DEL TIEMPO

A. Gómez-López, M. Cuenca-Estrella y J.L. Rodríguez-Tudela

Servicio de Micología. CNM-ISCIII. Majadahonda. Madrid.

Introducción: Recientemente el Subcomité de Antifúngicos del Comité Europeo para la evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos (AFST-EUCAST) ha establecido puntos de corte para Voriconazol (VRC) y algunas especies de *Candida* (<http://www.srga.org/eucast-wt/MICTAB/index.html>). Estos puntos de corte clasifican las cepas como resistentes cuando el valor de CMI para VRC es mayor de 0,125 mg/L y son aplicables a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Hemos evaluado el patrón de sensibilidad a voriconazol en cepas de *Candida* desde que la EMEA aprobó su uso como tratamiento de primera línea en infecciones asociadas a *Candida* en pacientes no neutropénicos y para el tratamiento de infecciones invasoras por *Candida* spp resistente a fluconazol y su evolución en estos años de uso.

Material y métodos: Se ha analizado la actividad in vitro VRC y fluconazol (FLC) frente 1.544 cepas de *Candida* recibidas en el Servicio de Micología del CNM-ISCIII, desde el año 2004. La CMI se determinó siguiendo las directrices del EUCAST.

Resultados: La distribución por especies de las cepas analizadas se resume a continuación: 697 cepas de *C. albicans* (45%), 304 *C. glabrata* (20%), 245 *C. parapsilosis* (16%), 194 *C. tropicalis* (13%), 81 *C. krusei* (5%), y 18 *C. guilliermondii* (1%). Un 5,16% de las cepas de *C. albicans* mostraron CMIs a VRC por encima del punto de corte recientemente establecido (CMI VRC > 0,125 mg/L). Se observa un incremento en el número de cepas resistentes a lo largo del periodo de estudio (0,67% en 2004 a 6,41% en 2008). Del mismo modo, un 2,04% de las cepas de *C. parapsilosis* y un 9,28% de las *C. tropicalis* mostraron CMIs elevadas a este antifúngico, con un incremento notable a lo largo del tiempo (0% a 3,26% para *C. parapsilosis* y 6,98% a 10,77% para *C. tropicalis*). La tasa de resistencia encontradas aplicando los mismos puntos de corte (VRC > 0,125 mg/L) varió entre 32,24% para *C. glabrata*, 93,83% para *C. krusei* y 38,9% para *C. guilliermondii*. Además, la frecuencia de aislamientos con CMI elevadas se incrementó desde un 18,52% a 40,0% en *C. glabrata* y se mantuvo por encima del 92% y el 20% para *C. krusei* y *C. guilliermondii* respectivamente. Todas las cepas con CMI elevadas a voriconazol mostraron resistencia cruzada a FLC (Media Geométrica de la CMI a FLC > 4 mg/L).

Conclusiones: La aplicación de los nuevos puntos de corte para VRC y su evaluación a lo largo del tiempo evidencia un notable incremento en la tasa de resistencia para especies de *Candida*.

258. EVALUACIÓN DE LOS PUNTOS DE CORTE DE FLUCONAZOL DEL CLSI Y EL EUCAST MEDIANTE TÉCNICAS DE MINERÍA DE DATOS

I. Cuesta¹, C. Bielza², P. Larrañaga², M. Cuenca-Estrella¹ y J.L. Rodríguez-Tudela¹

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. ²Departamento de Inteligencia Artificial. Facultad de Informática. Universidad Politécnica. Madrid.

Introducción: Los puntos de corte de fluconazol del CLSI y del EUCAST, son diferentes a pesar de que las metodologías de referencia empleadas producen resultados de CMIs similares. Así el CLSI considera que una cepa con una CMI ≥ 64 mg/L es resistente mientras que el EUCAST lo hace con una CMI ≥ 8 mg/L. Uno de los pasos más importantes para obtener estos puntos de corte es la correlación de las CMIs con la evolución clínica de los pacientes. El objetivo de este trabajo es analizar los datos disponibles en la literatura de correlación in vitro, in vivo del CLSI y del EUCAST mediante técnicas de Minería de Datos.

Material y métodos: Se identificaron 3 artículos en la literatura (Rex et al., CID 1997, 235; Clancy et al., AAC, 2005, 3171; Rodríguez-Tudela et al., AAC 2007, 3599) que contenían datos adecuados para ser analizados mediante algoritmos de clasificación supervisada. Cada una de las bases de datos generada se analizó individualmente. Se aplicaron los siguientes algoritmos: J48, OneR, Naïve Bayes, Simple Logistic (todos ellos disponibles en el software Weka) y CART. Se definió la MIC como variable predictora y se mantuvo la evolución de los pacientes como variable dependiente tal y como aparece en cada uno de los trabajos seleccionados. Se analizó la sensibilidad, especificidad, tasa de falsos positivos, el valor del área bajo la curva ROC y el Coeficiente de Correlación de Matthews (MCC) para cada modelo generado por los diferentes algoritmos.

Resultados: La tabla 1 recoge los resultados. El modelo generado por CART, para los 3 set de datos, predice fallo de tratamiento para una MIC > 4 mg/L, con un buen soporte estadístico. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos con otros clasificadores.

Conclusiones: Los puntos de corte que se obtienen al aplicar los diferentes algoritmos de clasificación a los 3 set de datos son similares y más próximos a los establecidos por el EUCAST. El análisis mediante estas técnicas puede ayudar a homogenizar la interpretación de los datos de correlación in vitro in vivo y ayudar a la obtención de puntos de corte globales para los antimicrobianos.

Tabla 1

Punto de corte de resistencia, sensibilidad, tasa de falsos positivos, área bajo la curva ROC y Coeficiente de Correlación de Matthews (MCC) para el mejor modelo obtenido (CART) en los 3 set de datos

	CMI mg/L	Sensibilidad %	FP %	Área bajo la curva ROC	MCC
Rex et al.	> 8	53	18	0,66	0,29
Clancy et al.	> 4	65	6	0,72	0,60
Rodríguez-Tudela et al.	> 4	87	8	0,89	0,80

259. DETECCIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A ANIDULAFUNGINA MEDIANTE DOS MÉTODOS, DE ORGANISMOS LEVADURIFORMES RESISTENTES A VARIOS ANTIFÚNGICOS

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

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

Introducción/Objetivos: Anidulafungina (AND) es una equinocandina que se presenta muy eficaz para el tratamiento de micosis invasoras producidas mayoritariamente por los géneros *Candida* y *Aspergillus*. Nos propusimos el estudiar la sensibilidad in vitro a este antifúngico utilizando dos métodos de microdilución en caldo: Método de Referencia (MR) (CLSI) y el nuevo panel de Sensititre YeastOne (SYO9).

Material y métodos: Se ensayaron un total de 110 cepas de organismos levaduriformes de las cuales 46 corresponden a *Candida parapsilosis*, 40 a *Candida albicans* (20 resistentes a fluconazol e itraconazol), 14 *Candida glabrata* (resistentes a fluconazol), 6 *Candida tropicalis*, 4 *Candida krusei*. Todas ellas fueron aisladas de diferentes muestras clínicas. La sensibilidad in vitro a AND se determinó por los dos métodos antes mencionados: siguiendo las especificaciones del documento M27-A2 del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) y las recomendaciones del fabricante en el nuevo panel de *Sensititre-YeastOne Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH*. La CMI en el se definió como la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición del crecimiento del 100% para el MR y el cambio de color de rojo a azul en el método colorimétrico. Las lecturas se realizaron a las 24 horas de incubación a 35 °C. El rango ensayado de AND fué de 0,008 y 16 µg/ml, como control de calidad se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Resultados: Las CMI 50/90 se expresan en µg/ml, por el MR de las diferentes especies fué: *C. parapsilosis* 1/8, *C. albicans* 0,03/0,06, *C. glabrata* 0,03/0,06, *C. tropicalis* 0,12/0,25, *C. krusei* 0,06/0,06. Las CMI 50/90 se expresan en µg/ml, por el SYO9 de las diferentes especies fué: *C. parapsilosis* 1/8, *C. albicans* 0,06/0,06, *C. glabrata* 0,06/0,12, *C. tropicalis* 0,25/0,25, *C. krusei* 0,12/0,12. Los porcentajes de correlación: método de referencia/método colorimétrico ± 2 diluciones oscilaron entre el 99-100%. Dos cepa de *C. albicans* manifestaron una CMI de > 4 µg/ml por los dos métodos.

Conclusiones: Los resultados demuestran que existe una elevada concordancia entre los métodos estudiados. Dada la facilidad de realización y lectura del método colorimétrico comercializado sugerimos la utilidad de éste método para determinar la sensibilidad a anidulafungina de los organismos levaduriformes (algunos de ellos resistentes a varios antifúngicos) aislados de muestras clínicas. No obstante se necesitan más estudios con un mayor número de cepas resistentes para determinar su capacidad de identificarlas.

260. COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE CANDIDA spp. FRENTA A CUATRO ANTIFÚNGICOS MEDIANTE DOS MÉTODOS: TARJETA AST-YSO1 DEL SISTEMA VITEK2 (BIOMERIEUX S.A.) VS MÉTODO DE MICRODILUCIÓN SENSITITRE (YEASTONE)

A. Pérez-García, A. Alonso-Arribas, M. Iñigo, M. Fernández-Alonso, G. Reina, J. Leiva y M. Rubio

Servicio de Microbiología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona.

Introducción y objetivos: Los métodos de microdilución para la determinación de la sensibilidad a antifúngicos en levaduras son los recomendados (norma M27-A2, CLSI). La aparición de un nuevo método de determinación de sensibilidad automatizado VITEK2 (bioMerieux® S.A.) se presenta como una alternativa útil que podría optimizar los resultados. El objetivo del estudio fue realizar una comparación entre la tarjeta AST-YSO1 VITEK2 y el método Sensititre YeastOne® (microdilución).

Material y métodos: Se estudiaron 96 aislamientos de *Candida spp* diferentes de *C. albicans* (35 *C. glabrata*, 24 *C. krusei*, 18 *C. tropicalis*, 10 *C. parapsilosis*, 8 *C. lusitaniae*, 1 *C. rugosa*) por el método de microdilución Sensititre y mediante las tarjetas AST-YSO1 del sistema VITEK2. En la microdilución se prepararon inóculos al 0,5 McFarland según la norma M27-A2 del CLSI haciendo la lectura de las CMIs a las 24 h. Para la determinación de las CMIs por el sistema VITEK2 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. tropicalis* y *C. dublinensis* procedentes de controles SEIMC y cepas ATCC.

Las CMIs para cada antifúngico se analizaron calculando su coeficiente de correlación de Spearman, r_s (o rho de Spearman). Para el análisis de la interpretación de las CMIs (S, I, R) se calculó el índice de Kappa de Cohen, k (medida de concordancia)

Resultados: El análisis de correlación mostró para la Anfotericina B una r_s de 0,238 (correlación baja) con $p < 0,05$; para el Fluconazol la r_s fue de 0,658 (correlación elevada), para la Flucitosina la r_s fue de 0,986 (correlación casi perfecta) y para el Voriconazol la r_s fue de 0,342 (correlación moderada) todos estos con una $p < 0,01$. Del análisis de concordancia obtuvimos: para la Anfotericina B, una k de 1 (concordancia perfecta), para el Fluconazol una k de 0,673 (concordancia sustancial), para la Flucitosina una k de 0,927 (concordancia casi perfecta) y para el Voriconazol una k de 0,425 (concordancia moderada)

Conclusiones: Existe en general una buena relación entre el sistema VITEK2 y el método de microdilución Sensititre tanto para CMIs como a nivel de interpretación de las mismas. Para la Anfotericina B se observa una buena concordancia aunque existen diferencias entre los valores de CMIs encontrados. El sistema automatizado VITEK2 permite una determinación precoz de CMIs (15 h), aunque sería deseable un panel de antifúngicos más amplio.

261. ESTUDIO DE RESISTENCIA Y DE FACTORES DE PATOGENICIDAD DE CANDIDA KRUSEI AISLADA EN HEMOCULTIVOS DE PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS

M.T. Blanco-Blanco, A. García-Tapia, M.C. Lozano Domínguez, P. Marín Casanova, P. García-Martos y A.C. Gómez-García¹

Hospital Universitario Puerta del Mar. Servicio de Microbiología. Cádiz.

¹Facultad de Medicina. Universidad de Extremadura. Departamento de Microbiología. Badajoz.

Candida krusei es un hongo oportunitista multirresistente, que cada vez con mayor frecuencia se aísla en hemocultivos de pacientes con leucemia. Esto posee una importante relevancia clínica y terapéutica, dada su resistencia intrínseca al fluconazol, en algunos casos combinada con una disminución de la sensibilidad a 5fluorocitosina y anfotericina B. A pesar de ello sus mecanismos de virulencia no son muy conocidos.

Tabla 1Características de los pacientes con *C. krusei* aislada de hemocultivos en 2008

	Edad	Sexo	Diagnóstico	Factores de riesgo	Profilaxis antifúng.	Tratamiento	Evolución
1	52	V	Leucemia aguda	Neutropenia Corticoides Tto antibiótico amplio espectro	No	Anfotericina B liposomal y Caspofungina	Curación
2	12	M	Leucemia aguda	Neutropenia Catéter Tto antibiótico amplio espectro	No	Anfotericina B liposomal	Curación

Tabla 2CMI a antifúngicos ($\mu\text{g/ml}$) a las 24 h y determinantes de patogenicidad de las cepas de *C. krusei* aisladas de hemocultivos en 2008

CMI a los antifúngicos								
	AMF-B CMI/C*	5 Fluorocit CMI/C	Fluconazol CMI/C	Ketoconazol CMI/C	Itraconazol CMI/C	Voriconazol CMI/C	Posaconazol CMI/C	Caspofungina CMI/C
1	0,5	16/I	64/R	0,25	0,25/S-DD	0,125/S	0,125/S	0,25/S
2	0,5	4/S	64/R	1	0,5/S-DD	0,125/S	0,125/S	0,25/S
Determinantes de patogenicidad								
Hidrofobicidad de Superficie Celular			Adherencia a Plástico			Biocapa a 37 °C		
	22,º C	37,º C		22 °C	37 °C	24 h	96 h	
1	96	93		0,13	0,09	0,19		
2	96	97		0,15	0,16	0,2		

C* = Categoría: S, sensible; S-DD, sensible-dosis dependiente; I, intermedio; R, resistente.

Objetivo: Estudiar los aislamientos en sangre de *C. krusei* en nuestro hospital en el año 2008. Valorar su CMI a los antifúngicos y estudiar determinantes de patogenicidad como hidrofobicidad de la superficie celular (HSC), adherencia a plástico y capacidad de formación de biocapa.

Métodos: Se estudiaron dos episodios de candidemia, cuyo aislamiento fue *C. krusei*. La identificación se realizó mediante ID 32C y crecimiento en Chromagar. La sensibilidad antifúngica mediante el método Sensititre YeastOne. La HSC se valoró por el método bifásico agua-hidrocarburo; la adherencia a plástico en microplaca por la técnica de Christensen; la formación de biocapa por la técnica de Ramage, valorando la DO de la biocapa adherida a los pocillos después de incubar las levaduras 24-96 horas.

Resultados: Las características de los dos pacientes con *C. krusei* se detallan en la tabla 1. La CMI a los antifúngicos de las cepas coincide con el patrón de resistencia de la especie. Ambas cepas cultivadas en Sabouraud, presentaron altos niveles de HSC y de adherencia a plástico; formaron biocapa con DO similar a la obtenida en la valoración de la adherencia (tabla 2).

Conclusión: Voriconazol y posaconazol muestran buena actividad, a pesar de la resistencia a fluconazol. Ambas cepas son muy hidrofóbicas y adherentes a plástico pero sus biocapas son de capa única, como la mayoría de las especies no productoras de hifas.

262. RESISTENCIA DE ESPECIES DE *CANDIDA* spp. AISLADAS DE HEMOCULTIVOS EN LAS DIFERENTES ÁREAS DEL SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA DR. JUAN I. MENCHACA

F. Velarde-Rivera^{1, 2*}, I. Hernández-Cañaveral², B. Vargas-Guerrero¹, G. Becerra², G. Carrillo², M. Domínguez² y E.P. Ascencio-Esparza^{1,3}

¹OPD Hospital Civil de Guadalajara "Juan I. Menchaca". ²Departamento de Microbiología y Patología. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. ³Instituto de Patología Infecciosa y Experimental. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara.

Introducción: En las últimas décadas, la frecuencia de las micosis invasoras en pacientes inmunosuprimidos o con tratamiento médico quirúrgicos ha sufrido un aumento significativo. Este tipo de micosis

se produce mayoritariamente por levaduras del género *Candida*. En general el fracaso terapéutico de un tratamiento antifúngico puede deberse a la resistencia microbiológica, ya sea intrínseca o secundaria, o a la resistencia clínica.

Objetivo: Identificar las especies de *Candida* aisladas de hemocultivos y realizar las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos.

Material y métodos: Se aislaron 80 cepas de *Candida* spp a las cuales se les realizó la identificación hasta especie del género *Candida*, para esto se utilizaron paneles de identificación rápida del sistema automatizado MicroScan (Dade Behring) y la susceptibilidad a los antifúngicos se realizó por el método comercial Sensititre YeastOne, (Alamar Blue) (AccuMed Internacional Ltd, UK).

Resultados: Durante el año 2008 se aislaron 80 cepas de *Candida* spp de hemocultivos en las diferentes áreas del servicio de pediatría, la especie más frecuentemente identificada fue *C. parapsilosis* 38 (47,5%), *C. albicans* 27 (33,8%), *C. tropicalis* 10 (12,5%), otras especies 5 (6,2%). La resistencia en *C. parapsilosis* fue de 5,3% para itraconazol, ketoconazol, fluconazol y voriconazol; en *C. albicans* 37% itraconazol, 18,5% ketoconazol, 14,8% fluconazol, 29,6% voriconazol y 3,7% 5-Fluorocitocina; en *C. tropicalis* 40% itraconazol, 10% ketoconazol, 40% fluconazol y 30% voriconazol; en las otras especies fue de 20% para itraconazol, ketoconazol, fluconazol y voriconazol.

Conclusiones: La identificación de los aislamientos de *Candida* hasta especie nos confirmó que la especie más frecuentemente aislada fue *C. parapsilosis*, seguida de *C. albicans* y el tercer lugar *C. tropicalis*. De las 80 cepas probadas podemos concluir que el porcentaje de resistencia global a itraconazol fue de 21,3%, a ketoconazol 11,3%, a fluconazol 13,8%, a voriconazol 17,5%. Para Anfotericina B y 5-fluorocitocina no se encontró resistencia en todas las cepas.

263. GENERACIÓN DE MUTANTES A CASPOFUNGINA EN *CANDIDA ALBICANS*: RESISTENCIA CRUZADA A OTROS ANTIFÚNGICOS

L. Soler, E. Pastor, J.C. Rodríguez, M. Ruiz, J. Villamor, S. Belda, R. Cremades, M.T. Moreno, N. Viciana, P. López y G. Royo

Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández.

Objetivos: Desarrollar un modelo in Vitro de exposición repetida a varias concentraciones de caspofungina en *Candida albicans* para ca-

	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25
C 1						
Casco	0,047	0,53 (x11,3)	2,72 (x57,9)	10,8 (x229,8)	21,4 (x455)	21,4 (x455)
Anfo	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
Fluco	0,38	0,50 (x1,31)	0,50 (x1,31)	0,75 (x1,97)	0,80 (x2,1)	0,80 (x2,1)
Itra	0,004	0,006 (x1,5)	0,006 (x1,5)	0,054 (x13,5)	0,090 (x22,5)	0,170 (x42,5)
Vori	0,012	0,012	0,012	0,030 (x2,5)	0,030 (x2,5)	0,030 (x2,5)
C 2						
Casco	0,023	0,048 (x2,1)	0,100 (x4,3)	0,100 (x4,3)	10,7 (x465,2)	11,3 (x491,3)
Anfo	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
Fluco	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Itra	0,003	0,005	0,005	0,005	0,005	0,060 (x20)
Vori	0,016	0,017	0,017	0,017	0,025 (X1,5)	0,025 (x1,5)

racterizar la aparición de cepas resistentes a este compuesto y las resistencias cruzadas de los mutantes a otros antifúngicos.

Material y métodos: Cepas: 2.aislados clínicos de *C. albicans*. La identificación y la sensibilidad antifúngica se confirmó en el Institutto Carlos III (Majadahonda, Madrid). Generación de mutantes: Cada cepa se cultivó en caldo MH 2% glucosa con distintas concentraciones de caspofungina (0,125, 0,25 y 1 ug/ml). Despues de 48 horas de incubación, se realizó un subcultivo a otro tubo de la misma concentración del antibiótico; este proceso se repitió 25 veces. Los días 5, 10, 15, 20 y 25 se estudio la variación de la sensibilidad antifúngica de los mutantes.

Estudio de la sensibilidad a los antifúngicos: Se estudió a caspofungina, anfotericina B, fluconazol, itraconozaol y voriconazol mediante E-test.

Resultados: Se observa una disminución leve en la sensibilidad a caspofungina a partir del día 5 de contacto y muy elevada a partir del día 10 para una cepa y del día 20 para otra. Respecto a las reacciones cruzadas con otros antifúngicos, se observan diferencias entre las dos cepas; mientras que en una cepa sólo se altera la sensibilidad a itraconazol, en la otra, se altera la sensibilidad a todos los otros fármacos excepto anfotericina, aunque también itraconazol es el que sufre una disminución mayor de su actividad. Los datos se detallan en la tabla.

Discusión: El empleo de caspofungina a dosis no adecuadas puede provocar la generación de mutantes resistentes en *Candida albicans*, aunque este fenómeno es variable en función de las características de las cepas. Además, puede influir en la actividad de los azoles, provocando una ligera disminución de su actividad, que es mayor en el caso del itraconazol. Esto puede estar asociado a sistemas de expulsión activa o a fenómenos de permeabilidad que no son específicos de cada fármaco. Este hecho llama la atención sobre la necesidad de utilizar dosis adecuadas que sean activas en el lugar de la infección.

264. BIOCAPAS, UNA FORMA DE MULTIRRESISTENCIA. EFECTO DE ITRACONAZOL SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOCAPAS DE CANDIDA DUBLINIENSIS

J.J. Morales, L. Lucio, M.T. Blanco, M.A. Galán, J. Blanco y A.C. Gómez-García

Departamento de Ciencias Biomédicas. Área de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Extremadura.

La formación de biocapa por un microorganismo permite proteger a las células incluidas en ella de la acción de los antimicrobianos, manteniendo la persistencia de células viables. Las concentraciones subinhibitorias (sub-CMIs) de algunos antimicrobianos pueden disminuir o estimular su formación. *Candida dubliniensis*, patógeno emergente, comenzó a aislarse en mucosa oral de pacientes VIH estando actualmente descritas candidiasis invasivas (Odds et al 2007). Generalmente sensible a los antifúngicos, es capaz de desarrollar resistencia a fluconazol y otros azoles (Quindós et al 2000).

Tabla

Biocapas (Bc) formadas por *C. dubliniensis* en presencia de sub-CMIs de itraconazol, en relación a su crecimiento (Crec)

Cepas	Control		Sub-CMIs de ITRACONAZOL					
	RPMI-1640		1/2 CMI		¼ CMI		1/8 CMI	
	Crec	BC (IS)	Crec	BC (IS)	Crec	BC (IS)	Crec	Bc (IS)
BA-529	0,93	0,44 (47)	0,39	0,36 (92)	0,41	0,39 (95)	ND	ND
BA-526	0,94	0,43 (46)	0,47	0,41 (87)	0,53	0,51 (96)	ND	ND
BA-524	0,89	0,40 (45)	0,39	0,29 (74)	0,49	0,45 (92)	ND	ND
BA-531	0,93	0,35 (38)	0,4	0,35 (87)	0,6	0,5 (83)	0,75	0,70 (93)
BA-523	0,94	0,20 (21)	0,33	0,15 (45)	0,43	0,25 (58)	ND	ND
BA-528	0,92	0,22 (24)	0,35	0,29 (82)	0,37	0,33 (89)	ND	ND
BA-530	0,94	0,25 (26)						
CECT	0,73	0,20 (27)						

Objetivo: De este trabajo fue estudiar en 8 cepas de *C. dubliniensis*, 7 procedentes de aislados clínicos y una cepa de colección (CECT 11455), el efecto de sub-CMIs de itraconazol sobre la formación de biocapa.

Material y métodos: Se valoró la formación de biocapa en microplacas cultivando las levaduras en RPMI-1640 durante 48 h en presencia de sub-CMIs de itraconazol. Se realizaron lavados leyendo posteriormente la DO de las biocapas adheridas a los pocillos. Se calculó el Índice de Slime (IS) como el porcentaje de biocapa formada en relación al crecimiento existente.

Resultados y discusión: Todas las cepas fueron sensibles a itraconazol (CMI < 0,125 mg/L). De las cepas estudiadas, 4 fueron más productoras de biocapa (intervalo DO 0,45-0,35) y las otras 4 la produjeron con menor densidad (intervalo DO 0,25-0,20). La presencia de sub-CMIs de itraconazol estimuló siempre la formación de biocapa, alcanzándose Índices de Slime muy superiores respecto al control libre de antifúngico (tabla). En trabajos anteriores habíamos encontrado que sub-CMIs de itraconazol estimulaban la adherencia a células bucales, aunque disminuían la HSC y paralelamente la adherencia a plástico (Blanco et al 2006).

Conclusión: Sub-CMIs itraconazol, disminuyeron significativamente el crecimiento de *C. dubliniensis* aunque estimularon la producción de biocapa. Ello puede originar el fracaso terapéutico en infecciones asociadas con biocapas.

265. ACTIVIDAD IN VITRO DE NUEVOS AZOLEOS SOBRE HONGOS FILAMENTOSOS RESISTENTES

A. González, C. Martín de la Escalera, E. López-Oviedo, A. Romero, M.T. González, J. Pemán¹ y E. Martín-Mazuelos

UGC de Microbiología. H.U. Virgen de Valme. Sevilla. ¹UGC de Microbiología. H.U. la Fe. Valencia.

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*, 3 *A. glaucus*, 2 *A. niger* y 1 *A. nidulans*), 18 *Hifomicetos hialinos* (10 *Fusarium* spp, 2 *Acremonium* spp, 6 otros hialinos), 14 *Zigomicetos* (6 *Mucor* spp, 5 *Rhizopus* spp, 3 otros zigomicetos), 19 *Dematiáceos* (7 *S. apiospermum*, 5 *S. prolificans*, 7 otros dematiáceos)

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 la CMI como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir 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 *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). Para Isavuconazol: mostraron menor CMI *Aspergillus* spp: con rango (0,5-4 µg/ml) y CMI₉₀: 4 µg/ml. Por especie *A. fumigatus* y *A. terreus* mostraron mayor sensibilidad con CMI₉₀ de 2 µg/ml. Destacar la importancia de esta CMI en *A. terreus* ya que es intrínsecamente R a Anfotericina B. Los demás hongos estudiados mostraron CMI₉₀ > 16 µg/ml, excepto algunas especies de *Dematiáceos* (*Bipolaris* spp, *Curvularia* spp y *Phoma* spp) que presentaron CMI más bajas (0,5; 0,5 y 0,03 µgr/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 CMI altas a Isavuconazol excepto *Aspergillus* spp. 3. Sería necesaria la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de estos hongos multirresistentes.

266. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS MULTIRRESISTENTES CAUSANTES DE MUCORMICOSIS: RHIZOPUS ORYZAE, RHIZOPUS MICROSPORUS Y MUCOR spp.

M.J. Buitrago, L. Bernal-Martínez, J.L. Rodríguez-Tudela
y M. Cuenca-Estrella

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

Introducción: En los últimos años, se ha producido un aumento en el número de enfermos con factores de riesgo de infección fúngica invasora (terapia antineoplásica, corticoterapia, etc.). Este hecho ha incrementado la probabilidad de que especies fúngicas menos frecuentes, raras o poco conocidas puedan causar una infección. La mucormicosis está producida mayoritariamente por especies del género *Rhizopus* seguido del género *Mucor*. Ambos géneros son resistentes a la mayoría de los antifúngicos, causando infecciones difíciles de tratar, con porcentajes elevados de mortalidad. Por ello, el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico precoz podría ayudar a mejorar el pronóstico de estas infecciones.

Objetivo: Análisis de la utilidad de la PCR-TR para la detección de ADN fúngico de *R. oryzae*, *R. microsporus* y *Mucor* spp. para su posterior evaluación como técnica de diagnóstico clínico

Material y métodos: Las reacciones de PCR-TR se llevaron a cabo en los equipos Chromo4 (MJ Research) y CFX (BioRad). Se diseñaron sondas Molecular Beacons e iniciadores específicos para cada patógeno, empleando el programa Beacon Designer 6.0 (Premier Biosoft International) y las bases de datos de secuencias del Servicio de Mi-

cología. Dichos iniciadores y sondas se dirigieron a las regiones ITS del ADN ribosomal. Se diseñaron PCRs específicas para *R. oryzae*, *R. microsporus* y *Mucor* spp. Se analizaron la sensibilidad y especificidad para cada especie. Se diseñaron rectas patrón de los logaritmos de concentraciones de ADN (de 20 ng a 2 fg) frente a los puntos de inflexión obtenidos mediante PCR-TR. También se incluyó ADN humano y de ratón como controles negativos.

Resultados: Las PCR-TR diseñadas detectaron ADN de las cepas analizadas. Los límites de detección se situaron en todos los casos entre 10-1 fg DNA/ml de muestra. La especificidad en todos los casos fue del 100% no obteniéndose fluorescencia cuando se empleó ADN de otros hongos relacionados. El coeficiente de determinación de las rectas patrón fue de 0,99. La media de la eficiencia de amplificación fue de 1,8. Se testó el método en muestras de dos pacientes con mucormicosis probada por *R. oryzae* detectándose ADN en ambos casos.

Conclusiones: 1. Estas técnicas de PCR-TR son sensibles y específicas para cada una de las especies y el género analizado. 2. Su elevada sensibilidad podría otorgarle una utilidad en el diagnóstico precoz de la IFI. 3. Deben evaluarse en un mayor número de enfermos.

267. ESTUDIO MULTICÉNTRICO, RETROSPETIVO DE 25 CASOS DE ZIGOMICOSIS PROBADA: FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA MORTALIDAD

E. García Quetglas*¹, I. Heras², V. Fraile³, P. García Sánchez⁴, J. López Jiménez⁵, M. Salaver⁶, I. Pérez Valero⁷, F. Bobillo⁸, A. Cantalapiedra⁹, J. Gómez¹⁰, M.A. Andreu¹¹, J. Fortún¹², M. Antona¹³, M. Heredia¹⁴, P. Martín Rico¹⁵, P. Martínez García¹⁶, Y. Sanduende¹⁷, C. Sarriá¹⁸, A. Bermúdez¹⁹, A. Llorente²⁰ y Grupo de Estudio de la Mucormicosis

¹Servicio de Farmacología. Clínica Universitaria de Navarra. ²Servicio de Hematología. Hospital Morales Meseguer. ³Servicio de Cuidados Intensivos. Hospital Río Hortega. ⁴Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Carlos. ⁵Servicio de hematología. Hospital Ramón y Cajal. ⁶Servicio de Microbiología. Hospital La Fe. ⁷Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Paz. ⁸Servicio de Cuidados Intensivos. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. ⁹Servicio de Hematología. Hospital Río Hortega. ¹⁰Servicio de Hematología. Hospital Central de Asturias. ¹¹Servicio de Hematología. Hospital de Móstoles. ¹²Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal. ¹³Servicio de Hematología. Hospital de Mérida. ¹⁴Servicio de Anestesia y Reanimación. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. ¹⁵Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos Haya. ¹⁶Servicio de Hematología. Complejo Hospitalario de Puerto Real. ¹⁷Servicio de Cuidados Intensivos. Complejo Hospitalario de Pontevedra. ¹⁸Servicio de Medicina Interna. Hospital La Princesa. ¹⁹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marques de Valdecilla. ²⁰Servicio de Hematología. Hospital Joan XXIII.

Objetivos: Identificar los factores de riesgo asociados a la mortalidad en pacientes con zigomicosis probada.

Material y métodos: Se diseñó un estudio multicéntrico, retrospectivo con el fin de identificar casos probados de zigomicosis diagnosticados durante 2006 y el primer semestre de 2007 en 17 hospitales de España. Se aplicaron los criterios EORTC actualizados.

Resultados: Se identificaron a 25 pacientes (20 hombres) con una mediana de edad de 46 (intervalo 21-76) años con zigomicosis probada. Los trastornos subyacentes más importantes fueron: hematológicos, 13 (52%); diabetes, 8 (32%); trasplante de órgano sólido, 3 (12%); traumatismo, 2 (8%); tumor sólido, 2 (8%); reumatológicos, 1 (4%) y en un caso no se identificó ningún trastorno subyacente. De los pacientes hematológicos, 11 (84,6%) presentaban enfermedad activa y todos eran neutropénicos (< 500 mm³). Trece pacientes (52%) usaron esteroides durante el mes previo al diagnóstico y otros inmunosupresores (52%). La mediana de los días desde el ingreso en el

hospital hasta el diagnóstico fue de 15 días. Se diagnosticó zigomicosis en 11 casos (44%) mediante técnicas histopatológicas o citopatológicas, en 7 casos (28%) mediante cultivo, y en los casos restantes (28%) utilizando ambas técnicas. La infección era rinoorbitocerebral en 7 casos (36%), diseminada, con afectación de tejidos blandos y de piel en 5 pacientes (20%) en cada caso, gastrointestinal en 3 casos (12%), rinoorbitocerebral + senos en 2 casos (8,0%) y otros en 3 (12%) casos. Diez pacientes (40%) habían recibido profilaxis (7 fluconazol, 3 itraconazol). Once (44%) recibieron tratamiento empírico o anticipado. Sólo 4/11 recibieron anfotericina B liposomal, uno combinado con caspofungina. Uno recibió otra formulación lipídica y los 6 pacientes restantes recibieron diferentes estrategias de tratamiento. Un paciente no recibió ningún tratamiento y los restantes 13 pacientes (52%) sólo iniciaron el tratamiento después del diagnóstico. Diecisiete pacientes (68%) se sometieron a cirugía. La mortalidad global fue del 72% y atribuible a zigomicosis en 13 casos (52%). Siete de 11 pacientes (53,8%) que recibieron antifúngicos después del diagnóstico murieron. En el análisis univariado la neutropenia y la enfermedad hemato-oncológica estaban significativamente asociados a la mortalidad; en el análisis multivariante no se identificaron factores de riesgo.

Conclusiones: La zigomicosis es una infección fúngica difícil de diagnosticar con una elevada tasa de mortalidad. Debe iniciarse tempranamente un tratamiento eficaz contra zigomicetos con el fin de reducir la mortalidad. La neutropenia y la enfermedad hemato-oncológica son factores de riesgo, aunque en el análisis multivariante no se identificaron factores de riesgo asociados a la mortalidad; esto podría haberse debido al pequeño tamaño de la muestra.

268. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DISEMINADA POR *FUSARIUM SOLANI*

L. Bernal, M.J. Buitrago, M.V. Castelli, J.L. Rodríguez y M. Cuenca

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Madrid.

Introducción: En los últimos años, se ha producido un aumento de las infecciones fúngicas invasoras (IFI) por hongos filamentosos. El aumento de su prevalencia está relacionado con la existencia de una mayor población de pacientes con factores predisponentes. Las infecciones del género *Fusarium* se caracterizan por tener el mayor índice medio de mortalidad, que se cifra entre el 70 y el 87%, y por la baja respuesta al tratamiento, considerándose patógenos fúngicos multirresistentes. *Fusarium solani* es la especie de este género que causa un mayor número de infecciones fúngicas invasoras ($\approx 50\%$). No todas las especies fúngicas responden por igual a los diferentes tratamientos antifúngicos. Por ello, deben realizarse esfuerzos para detectar estas infecciones de forma precoz e identificar la especie causante.

Objetivo: Optimización y desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Fusarium solani*, en un modelo murino de infección diseminada.

Material y métodos: Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el aparato LightCycler 480 (Roche Applied Science). Se diseñó una sonda específica de tipo Molecular Beacons e iniciadores específicos para este patógeno dirigidos a la región de ITS-1 (Internal Transcriber Spacer-1) del ADN ribosomal. La técnica fue desarrollada *in vitro* utilizando la colección de cepas del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Posteriormente, se validaron *in vivo* en un modelo murino de infección diseminada. La inoculación se llevó a cabo de forma intranasal y con un inóculo de 6×10^5 esporas/ml de *F. solani*. Se tomaron un total de 55 muestras de sangre, suero y pulmón de ratones CD1/SPF.

Resultados: Los resultados *in vitro* demostraron que la técnica tenía un límite de detección de 1 fg de ADN/ μ l de muestra analizada. La

especificidad fue del 100% ya que la técnica sólo amplificó ADN de la especie fúngica diana en las muestras procedentes del modelo animal. La sensibilidad de la PCR específica para *F. solani* fue del 94,2% en tejido de pulmón, 88,8% en suero y 45,4% en sangre.

Conclusiones: (i) La técnica desarrollada puede ser útil para el diagnóstico clínico de este tipo de infección. (ii) La validación realizada en el modelo murino de infección fúngica permite que la técnica pase a la siguiente fase de desarrollo, consistente en el análisis de su utilidad en muestras clínicas humanas.

269. ZIGOMICOSIS EN NUESTRA ÁREA

M.J. Linares, F. Solís, F. Rodríguez, A. Ibarra y M. Casal

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

Introducción/Objetivo: La zigomicosis o mucormicosis constituye, tras la candidiasis y aspergilosis, la tercera infección fúngica invasora. Dada las nuevas terapias antifúngicas así como el aumento de la población inmunodeprimida se ha reseñado por diversos autores un incremento del número de casos de zigomicosis. No propusimos observar la incidencia de casos de zigomicosis en nuestro Hospital.

Material y métodos: Se realiza una revisión de los zigomicetos aislados en nuestro Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, a partir de muestras patológicas de pacientes con sospecha de una enfermedad micótica, durante los años 2006-2008. La identificación se llevó a cabo mediante criterios macroscópicos de las colonias, crecimiento en medios específicos y criterios microscópicos. De las especies aisladas se realizó el estudio de sensibilidad *in vitro* a los siguientes antifúngicos: Anfotericina B, posaconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, ketoconazol, 5-fluoricitosina y caspofungina. Para ello se siguió dos métodos diferentes: el propuesto por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), denominado M38-A y el método comercializado Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Las lecturas de ambos métodos se realizaron a las 24 horas de incubación a 35 °C.

Resultados: En dicho periodo se identificaron un total de 32 cepas de hongos filamentosos sifonados o zigomicetos, distribuidos de la siguiente forma: 12 cepas de *Mucor circinelloides*, 8 *Rhizopus oryzae* (*arrhizus*), 6 *Mucor racemosus*, 4 *Cunninghamella bertholletiae* y 2 *Abidia corymbifera*.

Las muestras de las que fueron aislados fueron: 18 de exudados purulentos, 8 broncoaspirados, 4 raspados corneales, y 2 líquidos pleurales. Por sexo: 30 hombres y 2 mujeres. El rango de edad entre 7-96 años. Todas las cepas aisladas se manifestaron sensibles *in vitro* a anfotericina B, 28 fueron sensibles o sensibles dependiente de la dosis *in vitro* a posaconazol. Por el contrario todos los aislamientos se presentaron resistentes *in vitro* a todos los demás antifúngicos: Fluconazol, itraconazol, voriconazol, ketoconazol, 5-fluoricitosina y caspofungina.

Conclusión: La utilización de nuevos antifúngicos en tratamientos profilácticos, empíricos y dirigidos, así como el mayor número de enfermos inmunodeprimidos nos debe poner alerta del posible aumento de la incidencia de hongos multirresistentes a los antifúngicos como son los zigomicetos.

270. BROTE NOSOCOMIAL CAUSADO POR *SCEDOSPORIUM PROLIFICANS*

E. Torres¹, C. Miranda¹, M.L. Serrano¹, M.D. Rojo¹, E. González¹, J.M. Navarro¹, A. Fernández² y M. Rosales²

¹Servicio de Microbiología. ²Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Introducción: *Scedosporium prolificans*, es uno de los principales hongos filamentosos emergentes causantes de infección invasora en

pacientes inmunodeprimidos, además suele presentar resistencia a los antifúngicos disponibles.

Material y métodos: En el período febrero-abril de 2008, *S. prolificans* se aisló en muestras respiratorias de siete pacientes neutropénicos ingresados en el Servicio de Hematología del H.U. Virgen de las Nieves. Las muestras, cinco esputos y dos aspirados bronquiales se procesaron para estudio de bacterias y hongos. La identificación del hongo se llevó a cabo en base a la morfología de la colonia en el cultivo y a su morfología microscópica.

Resultados: Las hifas del hongo fueron visualizadas en la tinción de Gram de la muestra directa presentando, en algunos casos, morfología típica de *Scedosporium*. La presencia del hongo se detectó en cinco días aproximadamente en todos los medios, salvo en los que contenían cicloheximida. Las colonias eran planas, verde-grisáceas a negras, algodonosas. En la tinción de azul algodón de lactofenol, se observaron las características morfológicas diferenciales de la especie: hifas septadas y pie de la conidia con anillos abultados. Las muestras se remitieron al Instituto de Salud Carlos III, donde además de confirmar la identificación se realizó antifungígrama, siendo resistente a anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol, terbinafina y caspofungina en los siete casos. Los pacientes fueron tratados con voriconazol y terbinafina, falleciendo cinco de ellos, aunque no se consideró *S. prolificans* la causa directa de su muerte. Se tomaron muestras ambientales para cultivo, creciendo en una de ellas *S. prolificans*. Entre otras medidas preventivas, se realizó limpieza y desinfección e instalación de filtros de alta eficacia, y posteriormente se clausuró la unidad afectada para realizar remodelaciones estructurales.

Conclusiones: Los hongos oportunistas multirresistentes pueden originar brotes hospitalarios sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. Debido a la elevada resistencia a antifúngicos que presentan, las medidas preventivas y el diagnóstico microbiológico rápido son de máxima importancia. El tratamiento recomendado es la combinación de voriconazol y terbinafina, junto con factores estimulantes de colonias de granulocitos, ya que la recuperación de la neutropenia es determinante en los pacientes que han sobrevivido a la infección por *S. prolificans*.

en superficie de vidrio y poliestireno, con respecto a una cepa sensible de *H. pylori*.

Se empleó el aislamiento clínico resistente a Cla y Mtz HP796 y la cepa de referencia CCUG 11638 de *H. pylori*. Las cepas fueron cultivadas en Caldo Mueller-Hinton (CMH) con 0,3% de glucosa suplementado con a) 5% SFB y b) un suplemento alternativo de origen microbiano. Para la formación de biofilm se colocaron placas (2 cm²) de vidrio y poliestireno. Los cultivos fueron incubados en microaerofilia durante 196 h a 37 °C. Se realizó el recuento de viables (ufc/ml) para las bacterias formadoras de biofilm a 24, 48, 96 y 196 h. Los cambios morfológicos y de viabilidad fueron observados por fluorescencia utilizando el kit BacLight Live/Dead. Se analizaron genes de virulencia: ureA, flaA, omp18, lpxD; del quorum sensing: luxS, y housekeeping: 16S rRNA. La extracción de ARN, se realizó por el método del TRIzol.

Ambas cepas mostraron capacidad de formación de biofilm en las distintas superficies y medios ensayados. No obstante la cepa resistente presentó mayor capacidad de formación de biofilm ($p \leq 0,005$) permaneciendo viable hasta las 196 h. En ambas cepas se observó una mayor expresión de las células en el biofilm de luxS y genes de virulencia que en las células planctónicas. No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes analizados en ambas superficies y medios utilizados.

Este trabajo demuestra la capacidad de una cepa multiresistente de *H. pylori* de generar biofilm sobre distintas superficies y condiciones de cultivo conservando la expresión de genes de virulencia, lo que podría considerarse una ventaja selectiva para sobrevivir en ambientes naturales aumentando el riesgo de infección con cepas resistentes.

272. MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN *HELICOBACTER PYLORI* DIRECTAMENTE A PARTIR DE BIOPSIA GÁSTRICA

E. López-Girona, S. Belda, M. Ruiz, J. Sola-Vera¹, J. Sáez¹, J.C. Rodríguez, C. Sillero¹ y G. Royo

Servicio de Microbiología. ¹Servicio de Medicina Digestiva. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández.

Objetivo: La triple terapia con claritromicina, amoxicilina e IPB es de primera línea en el tratamiento de la infección por *H. pylori*. No obstante, existen cepas resistentes a los macrólidos que condicionan un fallo de erradicación. Nuestro objetivo ha sido detectar las mutaciones asociadas a la resistencia a claritromicina y para ello hemos diseñado un sistema de detección rápida de la misma sin necesidad de cultivar la biopsia gástrica.

Material y métodos: **Muestras:** 148 biopsias gástricas consecutivas obtenidas entre los años 2006 y 2008. La presencia de *H. pylori* se determinó por métodos clásicos y mediante la detección del gen de la ureasa de este microorganismo con PCR a tiempo real. **Extracción del DNA:** Se realizó mediante QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, USA). **Amplificación del fragmento del gen 23S rRNA:** Se realizó una primera amplificación con los cebadores HPY-S: 5'-cctcccgactgttacaaa-3' y 5'-aaagcctcccacatctctg-3. Para mejorar la sensibilidad de la técnica se realizó otra amplificación utilizando el primer amplificado como diana, utilizando los cebadores internos 5'-ggtgctcgaggtaagag-3 y 5'-aaagcctcccacatctctg-3

Tras visualizar el amplificado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, el proceso de secuenciación se realizó en ambas direcciones, enviando las muestras a Macrogen (Corea del Sur). **Análisis de los resultados:** Se estudió la presencia de mutaciones del gen, mediante el análisis del fragmento amplificado con el GenBank y comparando las secuencias con las de cepas sensibles y resistentes a claritromicina, previamente descritas en la literatura.

Resultados: Tras el análisis del fragmento amplificado de 244 bp hemos detectado la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia

Sesión 19: Otras bacterias multirresistentes

271. FORMACIÓN DE BIOFILM Y EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA POR CEPA MULTIRESISTENTE DE *HELICOBACTER PYLORI*

A.E. Vega¹, T. Alarcón², F.A. Persia¹, T.I. Cortiñas¹, M. López-Brea² y H.J. Silva¹

¹Área Microbiología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL. San Luis. Argentina. ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

En la infección por *Helicobacter pylori* es importante destacar dos aspectos epidemiológicos: el aumento de cepas resistentes a Claritromicina (Cla) y Metronidazol (Mtz) y el debate aún abierto respecto a la identificación de las vías de transmisión al ser humano. La posibilidad de que cepas resistentes de *H. pylori* tengan la capacidad de formar biofilm y existir como tal sobre superficies expuestas al agua podría dar indicios de otra vía de infección para este tipo de cepas, sumado a las ventajas selectivas de crecimiento que presentan frente a las cepas salvajes. El objetivo del estudio fue compararla capacidad de formación de biofilm de una cepa multiresistente a Cla y Mtz y la expresión de genes de virulencia durante la formación de biofilm