



Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Comunicaciones orales

Análisis de microsatélites mediante high resolution melting en un caso de candiduria recurrente por *Candida albicans*

Sara Gago¹, Isabel Cuesta¹, Belén Lorenzo², Alicia Gómez-López¹, Juan Luis Rodríguez-Tudela¹, Manuel Cuenca-Estrella¹ y María José Buitrago¹

¹Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

²Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de la Concha, Zamora, España

Antecedentes. Las infecciones recurrentes debidas a *Candida albicans* son frecuentes en los casos de vaginitis y candidiasis orofaríngea; los estudios de genotipificación demuestran que en la mayoría de los casos todos los episodios se deben a cepas clonales que sufren procesos de microevolución. Una de las técnicas de tipificación más empleadas en la actualidad es el análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar, técnica que presenta un gran poder de discriminación y alta reproducibilidad aunque el coste por muestra es elevado. Recientemente, se ha señalado que el desarrollo de técnicas basadas en *high resolution melting* (HRM) podría resultar de interés para el análisis de microsatélites.

Objetivos. Evaluar la utilidad de las técnicas de HRM para caracterizar microsatélites de 9 aislamientos de *C. albicans* de un paciente con candiduria recurrente.

Métodos. Se analizaron 9 aislamientos de *C. albicans* de un paciente con candiduria recurrente durante 5 años. Se seleccionaron 3 marcadores previamente descritos (HIS 3, EF 3 y CDC 3) y se analizaron mediante electroforesis capilar y HRM. El análisis de microsatélites mediante electroforesis capilar se realizó siguiendo la metodología publicada por Botterell et al (2001). Para ello, se incluyeron 20 cepas no relacionadas geográficamente como población control y los electrogramas se resolvieron con el programa GenMapper 4.0. Para el análisis de HRM, tras la amplificación las curvas fueron delineadas en presencia de ResoLight® (Roche, Madrid, España) tras un ciclo de desnaturalización/renaturalización en Light Cycler 450® (Roche, Madrid, España). Como población control se seleccionaron 7 cepas que habían presentado perfiles diferentes mediante la metodología de electroforesis capilar. El poder de discriminación de ambos métodos se calculó según el índice de biodiversidad de Simpson.

Resultados. El poder de discriminación de los tres marcadores mediante electroforesis capilar fue de 0,92 siendo el marcador CDC 3 el que presentaba menor capacidad de discriminación. Las cepas del episodio de candiduria recurrente presentaron el mismo perfil y diferente al de la población control para los tres marcadores, de modo que para HIS 3 y CDC 3 eran homocigotos, y heterocigotos para el marcador EF 3. En el análisis de HRM, en todos los casos, salvo la cepa CNM-CL 7020 con el marcador CDC 3, las cepas procedentes del paciente con episodio de candiduria recurrente formaron un *cluster* único a pesar de que el poder de discriminación de los tres marcadores fue menor (0,77). Mediante secuenciación se pudo comprobar

que la cepa CL 7020 presentaba una inserción que no era capaz de discriminar la electroforesis capilar.

Conclusiones. a) Según ambos análisis, las cepas que causaron los episodios de candiduria recurrente están relacionadas genéticamente, y b) el análisis de microsatélites mediante HRM es una técnica rápida y sencilla para establecer relaciones entre cepas de *C. albicans*.

Tipificación molecular de *Aspergillus fumigatus* mediante CSP y STRAf

Mar Martí Carrizosa¹, Francisca March Vallverdu¹ y Ferran Sánchez-Reus^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

²Departamento de Genética y Microbiología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Antecedentes. *Aspergillus fumigatus* es el agente causal de la mayoría de las aspergilosis invasoras, semiinvasoras e inmunoalérgicas. En pacientes inmunodeprimidos, puede ser causa de graves infecciones nosocomiales, debido a la existencia de reservorios intrahospitalarios o como consecuencia de obras de infraestructura y fracaso de las medidas de prevención. Con el propósito de identificar los patrones de transmisión y conocer la diversidad genética de este hongo filamentoso, se han descrito diversos métodos moleculares de tipificación tales como RAPD, AFLP, MLST, CSP y STRAf.

Objetivo. Evaluar la utilidad de dos métodos de tipificación de *Aspergillus fumigatus*, CSP y STRAf, tanto para identificar brotes nosocomiales como para diferenciar entre reinfección y recidiva en un mismo paciente.

Métodos. Se estudiaron 34 aislamientos de *A. fumigatus*, procedentes de muestras respiratorias de 14 pacientes del Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, obtenidas entre febrero de 2006 y marzo de 2011. De cada paciente se estudió un mínimo de dos aislamientos, obtenidos de muestras diferentes separadas más de 15 días.

El gen CSP, que codifica para una proteína de la superficie celular, se amplificó y secuenció. Las secuencias de ADN se analizaron con el programa VECTOR NTI 9.0.0 (Invitrogen) y se compararon con la cepa de referencia Af293 mediante un BLAST.

Para la tipificación mediante STRAf (Short Tandem Repeats for *A. fumigatus*), se amplificaron 9 loci incluidos en 3 grupos: M2 (dinucleótidos), M3 (trinucleótidos) y M4 (tetranucleótidos). Se estudió el tamaño de los fragmentos (ABIPRISM 3730) y se analizaron empleando el programa GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

Resultados. Mediante el estudio del gen CSP, se han identificado 7 tipos CSP distintos. Seis de ellos (t01, t02, t03, t04A, t10 y t14) ya habían sido identificados anteriormente en Holanda y el séptimo, t21, no había sido identificado con anterioridad en ningún otro estudio.

De los 14 pacientes estudiados, 2 pacientes presentaban los mismos tipos CSP en todos sus aislamientos, un paciente tenía 3 aislamientos con el mismo genotipo y 2 diferentes y en los otros once pacientes

todas las cepas estudiadas eran distintas, independientemente del tiempo transcurrido entre la obtención de los aislamientos.

Si consideramos que el mismo tipo CSP en un paciente corresponde a una única cepa, los tipos CSP más prevalentes fueron t03 (10/30) y t04A (9/30), seguidos de t02 (5/30), y t10 y t01 (2/30). Sólo se encontró un aislamiento de los tipos t14 y t21, y ninguno del resto de tipos descritos. El índice de diversidad de Simpson (ID) para CSP fue 0,774. El análisis de los 9 marcadores de STRAf, mostró 34 combinaciones diferentes para las 34 cepas aisladas. El ID calculado para cada grupo de modo independiente fue de 0,9985 para M3, 0,9929 para M2 y 0,985 para M4. El ID para los 3 grupos combinados fue de 0,999.

Conclusiones. La prevalencia de los tipos CSP obtenida en este estudio ha sido distinta a la obtenida en Australia y Holanda, lo que puede sugerir cierta distribución geográfica de las cepas de *A. fumigatus*. Asimismo, en este estudio se ha encontrado un nuevo tipo CSP no descrito anteriormente. Se ha detectado, tanto por CSP como por STRAf, una enorme variabilidad entre los diferentes aislamientos de un mismo paciente.

Para el estudio de los brotes nosocomiales, la técnica STRAf es la que ha presentado un mayor poder discriminatorio, aunque es necesario evaluar la posible inestabilidad atribuida a los microsatélites. La técnica CSP, por el contrario, aunque presenta un menor poder discriminatorio, puede constituir una buena estrategia de primera línea para la tipificación de *A. fumigatus* en caso de brotes nosocomiales.

Identificación de las especies crípticas del complejo *Candida glabrata* mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) combinado con cromatografía líquida desnaturalizante (DHPLC)

Oiana Telleria¹, Guillermo Ezpeleta¹, Ilargi Miranda², Guillermo Quindós² y Ramón Cisterna¹

¹Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Bizkaia, España

²Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Leioa, Bizkaia, España

Antecedentes. Durante las últimas décadas, las infecciones fúngicas han aumentado significativamente, convirtiéndose en una importante causa de morbilidad y mortalidad. Aunque *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada, la proporción de especies de *Candida* no *C. albicans* está aumentando. En Europa, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* son la segunda y tercera causa de candidiasis invasiva respectivamente. La descripción de distintas especies filogenéticamente relacionadas con distintos perfiles de la sensibilidad en el complejo *C. glabrata* (*Candida bracarensis* y *Candida nivariensis*) ha suscitado la necesidad de desarrollar un método nuevo para distinguir e identificar estas tres especies entre ellas.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método nuevo de cribado para la identificación de las especies crípticas de *C. glabrata*.

Métodos. Se ha desarrollado un método combinando la PCR en tiempo real (RT-PCR) y la cromatografía líquida desnaturalizante (DHPLC) (Transgenomic, Omaha, NE, EE. UU.). Se extrajo el ADN obtenido a partir de cultivos puros de las cepas de referencia (*C. glabrata* [04.229], *C. bracarensis* [NCYC-3133] y *C. nivariensis* [04.228]) sembradas en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol a 35 °C durante 24 h, empleando el sistema MagNAPure Compact (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Del ADN obtenido se amplificó la región ITS2 con los primers ITS86-F y ITS4-R, mediante PCR en tiempo real con SYBRGreen I en termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Science). Los productos de PCR obtenidos fueron purificados utilizando un kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Mobio Laboratorios, Carlsbad, EE. UU.).

Una vez purificados los amplicones fueron secuenciados usando la prueba BigDye Terminator Cycle sequencing v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en el Analizador Genético 3130 (Applied

Biosystems) para confirmar las especies. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de GeneBank usando el programa BLAST siguiendo las normas de identificación propuestas por el CLSI. Confirmada la especificidad de los productos de PCR, se realizó la puesta a punto y optimización de la técnica de separación e identificación de las tres especies mediante DHPLC usando WAVE-MD System (Transgenomic). Para la separación de las especies, se introdujeron 5 µl de una mezcla de los productos de PCR de las tres cepas analizando a diferentes temperaturas y gradientes precalculados por el programa. La identificación de éstas se llevó a cabo analizando cada muestra por separado en las condiciones óptimas. Una vez optimizado el sistema, se analizó una colección de 96 cepas identificadas fenotípicamente como *C. glabrata* para comprobar la existencia de alguna especie críptica.

Resultados. La temperatura óptima y el gradiente utilizados fueron establecidos teniendo en cuenta la resolución y la simetría de los picos de cada una de las especies, y se reflejan en la tabla adjunta:

Temperatura (°C): 58		Flujo (ml/min): 0,9	
Gradiente	Tiempo (min)	%A	%B
Carga	0	48	52
Comienzo del gradiente	0,5	43	57
Gradiente final	5	34	66

Todas las cepas identificadas como *C. glabrata* se confirmaron como tal.

Conclusiones. La combinación de la RT-PCR con el DHPLC permite la rápida identificación simultánea de la *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* en muestras de cultivo.

Diseño de una PCR múltiple a tiempo real para la detección y discriminación de las secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi* del género *Aspergillus*

Jimena Victoria Fernández-Molina¹, Ana Abad¹, Teresa Velayos¹, Joseba Bikandi², Andoni Ramírez-García¹, Fernando Luis Hernando¹, Javier Garaizar² y Aitor Rementería¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia, Leioa, Bizkaia, España

²Departamento de Tecnología y Facultad de Farmacia, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, España

Antecedentes. *Aspergillus* es un género constituido por hongos micopóricos y caracterizado por su ubicuidad. Su gran importancia consiste en la capacidad de contaminar y deteriorar los alimentos con producción de micotoxinas, y de causar infecciones en animales y seres humanos, algunas de ellas muy graves. Actualmente, este género incluye más de 250 especies agrupadas en 8 subgéneros subdivididos en 18 secciones (Machida y Gomi, 2010). Entre ellas, son muy interesantes la sección *Fumigati*, al incluir la especie *Aspergillus fumigatus* (el principal patógeno), y las secciones *Nigri* y *Flavi*, que incluyen otras especies patógenas importantes y las principales especies productoras de micotoxinas.

La identificación de las secciones y especies de este género se realiza mediante amplificación, secuenciación de los amplificadores y comparación con bases de datos internacionales de regiones ITS1-2 (para sección) y otras dianas como β -tubulina (para especie) (Balajee et al, 2007). Esto puede retrasar la detección hasta 48 h o más. Además, no todos los laboratorios tienen sistemas de secuenciación, por lo que deben enviar las secuencias a laboratorios especializados.

Objetivos. Desarrollar una técnica de PCR múltiple a tiempo real para detectar y discriminar rápidamente las secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi* del género *Aspergillus*.

Métodos. Microorganismos: Se utilizó una colección de 30 cepas de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (14, distribuidas en 7 secciones), hongos filamentosos (11) y levaduras (5). También se utilizaron 30 aislamientos fúngicos ambientales. PCR múltiple a tiempo real: Se diseñaron cebadores para amplificar las regiones

ITS1-2 de los hongos y tres sondas Taqman específicas marcadas con FAM, HEX o Texas Red. Muestras de infección experimental: Se utilizaron muestras de órganos de animales (ratones BALBc) infectados por vía IV con *A. fumigatus*. Los protocolos de infección animal han recibido el visto bueno del comité de ética y bienestar animal de la UPV/EHU.

Resultados. Se optimizaron los ensayos de PCR a tiempo real con las cepas *A. fumigatus* 2071 (CECT), *A. niger* 2094 (CECT) y *A. flavus* 204304 (ATCC), como representantes de las secciones de estudio. Posteriormente, se aplicaron por separado o junto al ADN extraído de la colección de hongos y de los aislamientos fúngicos ambientales. Solamente las cepas pertenecientes a las secciones Fumigati, Nigri y Flavi de la colección reaccionaron con las sondas diseñadas para cada una de ellas, demostrándose su especificidad. Asimismo, al aplicar la técnica a muestras de órganos de ratones BALBc, sólo mostraron reacción con la sonda de la sección Fumigati los riñones infectados.

La falta de interferencia por parte de otras especies y géneros, junto con la reacción positiva en riñones de animales infectados, demuestra la utilidad de la técnica y ha permitido el depósito de una patente (Patente n.º P201131497, 15 de septiembre de 2011).

Conclusiones. La PCR múltiple a tiempo real diseñada permite en un único paso y en un tiempo de tres horas, incluyendo la extracción del ADN, la detección y discriminación de las secciones Fumigati, Nigri y Flavi del género *Aspergillus*.

Identificación de aislamientos clínicos de *Bipolaris* y *Exserohilum* spp. procedentes de los Estados Unidos

Keith Cássia da Cunha¹, Deanna A. Sutton², Josep Cano¹, Josep Guarro¹ y Josepa Gené¹

¹Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

²Universidad de Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, Estados Unidos

Antecedentes. Los géneros *Bipolaris* y *Exserohilum* incluyen especies cosmopolitas que suelen desarrollarse como organismos saprobios sobre substratos vegetales. Sin embargo, algunas de ellas se han descrito como agentes responsables de procesos alérgicos o infecciones subcutáneas en animales y seres humanos. El laboratorio de referencia de la Universidad de Texas recibió entre los años 2003 y 2010 un total de 138 cepas aisladas de distintos especímenes clínicos, procedentes de diversas localidades de los Estados Unidos, que fueron identificadas como pertenecientes a los géneros *Bipolaris* (n = 104) y *Exserohilum* (n = 34).

Objetivos. En el presente estudio nos propusimos caracterizar morfológica y molecularmente dichos aislamientos para la identificación de las especies y así conocer su incidencia en los procesos infecciosos de donde se aislaron. Además, se determinaron los patrones de sensibilidad antifúngica in vitro de las especies identificadas.

Métodos. El estudio morfológico consistió en la siembra de los aislamientos clínicos en agar patata zanahoria (PCA) y agar harina de avena (OA) e incubación a 25 °C durante 3 semanas. La identificación morfológica se realizó siguiendo las directrices de Ellis (1971, 1976) y Sivanesan (1987). La identificación molecular se realizó mediante el análisis y comparación de secuencias de la región ITS de los aislamientos con las cepas tipo o de referencia de las especies identificadas morfológicamente o similares. Se ensayaron un total de nueve antifúngicos siguiendo el protocolo establecido por la CLSI documento M38-A2.

Resultados. La correlación entre la identificación morfológica y molecular nos permitió determinar que de los aislamientos de *Bipolaris*, un 67,3% correspondía a *Bipolaris spicifera* (n = 70), un 18,2% a *Bipolaris hawaiiensis* (n = 19) y un 1,9 % a *Bipolaris australiensis* (n = 2). Sin embargo, en un 12,6% (n = 13) de los aislamientos no pudo establecerse la especie por falta de correlación morfológica-mole-

cular. Un 94,1% (n = 32) de las cepas de *Exserohilum* fueron morfológicamente identificadas como *Exserohilum rostratum* y un 5,9% (n = 2) como *Exserohilum longirostratum*. Sin embargo, el análisis de los ITS de los aislamientos clínicos mostró un 100% de homología y prácticamente se obtuvo el mismo resultado al comparar los de las cepas tipo o de referencia de las tres especies de *Exserohilum* descritas hasta la fecha en clínica (*E. rostratum*, *E. longirostratum* y *E. meginnisii*, 99,6% de similitud). La mayoría de las cepas de ambos géneros se aislaron de la región nasal (34%), seguido de lesiones cutáneas (19%) y ojos (14%). Las especies de *Bipolaris* identificadas fueron resistentes al fluconazol y a la 5-fluorocitosina. Todas las cepas de *Exserohilum* fueron sensibles a los antifúngicos ensayados, aunque 7 de ellas se inhibieron con valores CMI elevados para caspofungina y micafungina.

Conclusiones. La especie de mayor incidencia entre los aislamientos clínicos de *Bipolaris* fue *B. spicifera*. El análisis de la región ITS sugiere que *Exserohilum rostratum* es la única especie del género implicada en infecciones humanas. No observamos ninguna correlación entre las especies identificadas y los lugares de infección. Las especies identificadas de ambos géneros son sensibles a los antifúngicos ensayados, excepto las de *Bipolaris* que fueron resistentes al fluconazol y a la 5-fluorocitosina.

Caracterización del patrón de reconocimiento antigénico de anticuerpos específicos frente al tubo germinal de *Candida albicans* mediante un análisis proteómico

Aranzazu Sáez-Rosón¹, Olatz Albaina¹, María Soledad Cuétara² y María Dolores Moragues¹

¹Universidad del País Vasco, Leioa, Bizkaia, España

²Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España

Antecedentes. El diagnóstico de la candidiasis invasora (CI) resulta difícil debido a la falta de signos específicos de la enfermedad y a la dificultad para diferenciar entre colonización e invasión. La fase micelial de *Candida albicans* está asociada con el proceso de invasión del hongo, por lo tanto, la detección de anticuerpos que reconozcan de forma específica antígenos presentes en la pared celular del micelio de *C. albicans* (CAGTA) podría ser una buena herramienta diagnóstica, como ya han avanzado algunos autores tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunocomprometidos¹⁻⁷.

Objetivo. Determinar el patrón de reconocimiento de los CAGTA en pacientes con CI, mediante electroforesis bidimensional en geles de poliácridamida (2D-PAGE), Western Blotting (WB) y espectrometría de masas (MS).

Pacientes y métodos. Se seleccionó a 4 pacientes con CI probada debida a *C. albicans* y con títulos CAGTA positivos, y 4 pacientes sin ninguna evidencia clínica ni microbiológica de CI y con títulos CAGTA negativos como grupo control.

La presencia de CAGTA en los sueros se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta³. Los sueros fueron adsorbidos con blastosporas de *C. albicans* tratadas con calor para retirar los anticuerpos anti-manano y posteriormente se incubaron con una suspensión de micelios de *C. albicans* muertos en formalina. Los CAGTA se eluyeron con ioduro sódico 2,5M y se analizó mediante WB su reactividad frente a un extracto DTT de la pared celular de *C. albicans* NCPF 3153 en su fase micelial⁷ previamente separado por 2D-PAGE. Las proteínas reactivas se analizaron mediante LC-MS/MS y posterior búsqueda en las bases de datos NCBI y SwissProt para su identificación.

Resultados. El análisis WB reveló varias proteínas reconocidas por los CAGTA presentes en los pacientes con CI, de las cuales 12 pudieron ser identificadas mediante MS. En los extractos del 100% de los pacientes se detectaron las siguientes proteínas: fosfoglicerato cinasa (Pgk1), enolasa 1 (Eno1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gap1); en el 75% metionina sintasa (Met6), Hsp90, Egd2 (nascent polypeptide-associated complex subunit alpha); en el 50% alcohol deshidrogenasa (Adh1), fructosa bisfosfato aldolasa (Fba1), proteína homóloga 14-3-3 (14-3-3) y transaldolasa (Tal1); en el 25%

Hsp71, inositol-3-fosfato sintasa (Ino1). Todos los sueros del grupo control fueron negativos.

Conclusiones. La Pgl1, Eno1 y Gap1 son los principales antígenos presentes en la pared celular de la fase micelial de *C. albicans* NPCF 3153 reconocidos específicamente por los CAGTA de pacientes con CI probada.

Bibliografía

1. García-Ruiz JC, et al. J Clin Microbiol. 1997;35:3284-7.
2. Iruretagoyena JR, et al. Rev Iberoam Micol. 2006;23:50-3.
3. Moragues MD, et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:83-8.
4. Pemán J, et al. Mycoses. 2010;53:424-33.
5. Pontón J, et al. J Clin Microbiol. 1994;32:217-9.
6. Quindós G, et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990;9:178-83.
7. Smail EH, et al. Infection and Immunity. 1984;45:74-81.

Importancia de la colonización por *Candida* en el síndrome de la boca ardiente

Sandra Gil-Alonso¹, Oihane Alboniga¹, Verónica Zamanillo¹, Elena Eraso¹, Nerea Jauregizar², Eduardo Ginestál³ y Guillermo Quindós¹

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

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

³Cátedra de Medicina Bucal, Departamento de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

Antecedentes. El síndrome de la boca ardiente (SBA) es un cuadro patológico oral frecuente en mujeres. La etiología es desconocida pero parece multifactorial y han sido sugeridas varias causas, entre las que se encuentra la colonización por *Candida*.

Objetivos. Determinar la frecuencia de la colonización por *Candida* en pacientes con SBA.

Pacientes y métodos. Se estudiaron muestras tomadas con torunda del dorso lingual y/o de la prótesis y mucosa subyacente de 105 pacientes con SBA (40 con prótesis dental) y 89 con otras patologías orales (OPO, 15 con prótesis), desde el año 2008 hasta el momento actual.

Las muestras se cultivaron durante 48 h a 37 °C en los medios cromógenos ChromID *Candida* (bioMérieux, Francia) y *Candida* Chromogenic Agar (Laboratorios Conda, España). La identificación de los aislamientos se realizó por métodos micológicos convencionales y, en los casos necesarios, se confirmó la identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos.

Resultados. De los 105 pacientes con SBA, 45 (42,9%) estaban colonizados por *Candida* (28 eran portadores de prótesis, 62,2%). De los 89 pacientes con OPO, 40 estaban colonizados (44,9%), 11 con prótesis (27,5%). En pacientes con SBA, la especie más frecuente fue *Candida albicans* (24 de 45 pacientes, 53,3%). En 2 de los pacientes se aisló *Candida parapsilosis* (4,4%) y *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida lipolytica* en 3 pacientes (2,2%). En 16 pacientes se observó una colonización mixta por dos o más especies de *Candida*, con 6 tipos de combinaciones diferentes, siendo la de *C. albicans* y *C. glabrata* la combinación más frecuente (en 7 pacientes, 15,6%), seguida por la de *C. albicans* y *C. parapsilosis* (en 5 pacientes, 11,1%). Destacaba la presencia de *C. glabrata* en un paciente con SBA y prótesis (3,6%) y la de dos pacientes sin prótesis con *C. parapsilosis* (11,8%), otro con *S. cerevisiae* (5,9%) y otro con *C. lipolytica* (5,9%). Los cultivos mixtos eran más frecuentes en pacientes con SBA con prótesis (13 de 28 pacientes, 46,4%) que en pacientes sin prótesis (3 de 17, 17,6%). En pacientes con OPO, la especie más frecuente también fue *C. albicans* (21 de 40 pacientes, 52,5%). En este grupo se observaron 9 combinaciones diferentes de cultivos mixtos, siendo la de *C. albicans* y *C. parapsilosis* la más frecuente (4 de 40, 10%), seguida de la de *Candida guilliermondii* y *C. parapsilosis* (3 de 40, 7,5%). Destacaba el aislamiento

en cinco pacientes portadores de prótesis de *Candida tropicalis* siempre en combinación con otras especies y la presencia de *Candida dubliniensis* en 2 pacientes no portadores de prótesis. Los cultivos mixtos más frecuentes fueron en pacientes con OPO con prótesis (7 de 11 pacientes, 63,6%) que sin prótesis (10 de 29, 34,5%).

Conclusiones. La colonización oral por *C. albicans* predominaba en todos los grupos estudiados y no era mayor en pacientes con SBA. Sin embargo, la presencia de prótesis dental favorecía la colonización por dos o más especies de *Candida*. Finalmente, se aisló *C. dubliniensis* en dos pacientes sin SBA que no portaban prótesis.

Financiación. Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), S-PR10UN03 (Saiotek 2010, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco) y NUPV08/26 (Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).

Estudio de la virulencia en aislamientos clínicos de diferentes especies de *Acremonium* spp.

Fabiola Fernández¹, Javier Capilla², Emilio Mayayo¹ y Josep Guarro²

¹Unitat d'Anatomia Patològica i Microbiologia, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

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

Antecedentes. *Acremonium* es un género polifilético que comprende alrededor de 150 especies, siendo la mayoría de ellas saprobitas del suelo y/o patógenas de plantas e insectos. Sin embargo, algunas especies han demostrado capacidad para causar procesos infecciosos en humanos, especialmente micetomas y queratitis. En los últimos años se han incrementado los reportes de infecciones invasivas con consecuencias fatales. En la mayoría de los casos, el agente etiológico es identificado como *Acremonium* spp., motivo por el cual la incidencia real en clínica de las diferentes especies es desconocida. Recientemente, y mediante estudios moleculares, se han identificado varias especies de *Acremonium* que previamente no habían sido relacionadas con infecciones, entre ellas *Acremonium kiliense*, *Acremonium implicatum* y *Acremonium esclerotigenum*-*Acremonium egyptiacum*.

Objetivos. Evaluar el grado de virulencia de las recientes especies de *Acremonium* asociadas a clínica mediante la infección experimental sistémica en ratones.

Métodos. Dos cepas de *A. kiliense*, *A. implicatum* y *A. esclerotigenum*-*A. egyptiacum* fueron incluidas en el presente estudio. La infección experimental se realizó en ratones OF-1 (de 30 g de peso) mediante inoculación intravenosa de una suspensión de conidios. Se establecieron 12 grupos de 20 ratones OF-1 de 30 g de peso que fueron inoculados intravenosamente con 2×10^6 o 2×10^8 conidios/animal de cada una de las cepas. Diez animales de cada grupo fueron asignados para el estudio de supervivencia y otros 10/grupo para evaluar la carga fúngica de afectación histológica en órganos.

Resultados. Se observó una correlación entre el tamaño del inóculo y la tasa de supervivencia de los ratones infectados. Los inóculos bajos causaron una mortalidad de entre el 30 y el 70%, a diferencia de aquellos animales infectados con el inóculo alto, cuya mortalidad fue del 100% entre los días 5-8 después de la infección. Todos los órganos de los animales infectados con el inóculo alto presentaron una carga fúngica estadísticamente significativa con respecto a aquellos infectados con el inóculo bajo, siendo bazo el más afectado. Si bien no se observaron diferencias significativas en la mortalidad de animales infectados con diferentes especies, la carga fúngica en órganos fue superior en aquellos animales infectados con *A. kiliense*.

Conclusiones. Todas las especies de *Acremonium* fueron capaces de causar infección diseminada en los animales, siendo la infección más grave con inóculos mayores. La especie *A. kiliense* presentó una mayor virulencia en comparación a las otras especies evaluadas.

Evaluation of antifungal activity of chitosan using *Neurospora crassa* and other fungal pathogens

Federico López Moya^{1,2}, M. Francisca Colom Valiente²
and Luis Vicente López Llorca¹

¹Laboratory of Plant Pathology, Multidisciplinary Institute for Environment Studies (MIES) Ramón Margalef, Department of Marine Sciences and Applied Biology, University of Alicante, Alicante, Spain

²Laboratory of Mycology, Microbiology Division, Medicine School, Miguel Hernández University, Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain

Background. Chitosan (polymer β -1, 4 glucosamine) is a natural polymer derived from chitin by partial deacetylation, and has fungicidal activity due to membrane permeabilization of sensitive fungi, which leads to fast death. Assessments of colony growth and conidia germination have been used to evaluate antifungal action of chitosan. These methods are cumbersome and time-consuming. Some available standardized methods to evaluate antifungal agents (NCLS and EUCAST) are not fully optimized for filamentous fungi due to the heterogeneity associated with their growth. These methods have not been applied to test the antifungal activity of chitosan yet.

Aims. In this work we present an optimized method for evaluating the effect of chitosan on conidia germination of human, plant and nematode fungal pathogens.

Methods. The microdilution method optimized for filamentous fungi follows the CLSI M-27 and EUCAST standards. We performed this work with *Neurospora crassa* (model fungi) and other fungal pathogens (*Fusarium oxysporum*, *Pochonia chlamydosporia*, *Beauveria bassiana*). The fungal growth was evaluated from different initial inocula (103-107 conidia/ml) to identify the lag, exponential and stationary growth phases. We selected the best initial inoculum (e.g. early exponential growth conditions) for evaluating the antifungal activity of chitosan on *N. crassa* and the selected fungal pathogens. The effect of T8s chitosan (Marine Bioproducts) was tested spectrophotometrically on *N. crassa* at early exponential growth conditions. Chitosan was tested at high concentration (2mg/ml) in RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) and PDB (Potato Dextrose Broth, Becton Dickinson).

Results. Chitosan reduced (respect to controls) *N. crassa* growth by 33% and 53% in RPMI and PDB (rich media) respectively. In poor media (RPMI 1/100 and PDB 0.25%) and water, chitosan also reduced the growth (RPMI 1/100 42%, PDB 0.25 48% and water 44%) with regard to controls ($P < 0.05$).

Conclusions. We have shown that microtiter spectrophotometry methods can be used for high-throughput evaluation of antifungal action of chitosan in filamentous fungi.

Estudios de sensibilidad in vitro de *Candida guilliermondii*, un patógeno emergente

Katihuska Paredes, Javier Capilla, Josep Guarro
y Francisco Javier Pastor

Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, Reus, España

Antecedentes. El género *Candida* está formado por unas 200 especies. Sin embargo, más del 90% de las candidiasis en los seres humanos son atribuidas a solo 5 especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. No obstante, otras especies menos frecuentemente aisladas en clínica, como *Candida guilliermondii*, han emergido en los últimos años causando infecciones graves. *C. guilliermondii* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y es, a su vez, parte de la microbiota humana. Sin embargo, ha sido reconocido como agente causal de oncomicosis, endocarditis, artritis, osteomielitis, periodontitis e infecciones diseminadas, especialmente en pacientes inmunodeficientes.

Actualmente, el tratamiento de la candidiasis diseminada consiste en la administración de fluconazol (FLC) o equinocandinas. Sin embargo,

se han descrito casos de fallo terapéutico, debido a la menor sensibilidad de esta especie a FLC y a las equinocandinas, como han demostrado diferentes estudios realizados in vitro.

Objetivo. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de anfotericina B (AMB), FLC y anidulafungina (AND), y las cinéticas de mortalidad (curvas de mortalidad) para diferentes cepas de *C. guilliermondii*.

Métodos. Se incluyeron 4 aislamientos clínicos de *C. guilliermondii*. La determinación de las CMI se realizó siguiendo el método de microdilución descrito por el CLSI (documento M27-A3). Los aislamientos fueron sembrados en caldo RPMI e incubados a 35 °C durante 24 h.

Para las curvas de mortalidad se utilizaron suspensiones en RPMI de 5×10^5 UFC/ml de *C. guilliermondii* en presencia de distintas concentraciones de AMB, FLC o AND (rango de 0,03 a 32 µg/ml). Tras 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas de incubación a 35 °C, 30 µl de cada suspensión fueron transferidos a placas de Petri con agar dextrosa patata (PDA) para el posterior recuento de colonias.

Resultados. Se obtuvieron valores CMI para FLC entre 0,5-1 µg/ml, y 0,06-0,25 µg/ml para AND. No se detectaron aislamientos resistentes ni una sensibilidad aumentada como han descrito otros autores previamente. La CMI obtenida para AMB varió entre 0,25-1 µg/ml. Los resultados de las curvas de mortalidad realizadas con AMB demostraron que a concentraciones ≥ 2 µg/ml, AMB tiene actividad fungicida tras 24 h de incubación en todos los aislamientos evaluados.

Conclusiones. Los valores CMI de AMB, FLC y AND obtenidos están dentro del rango considerado como indicador de sensibilidad para *Candida* spp. Sin embargo, es necesario incluir más aislamientos clínicos para obtener resultados concluyentes. Asimismo, es necesario realizar terapias experimentales en modelos animales de infección diseminada por *C. guilliermondii* con el objetivo de establecer una relación entre valores CMI, cinéticas de mortalidad y eficacia in vivo.

Las especies de *Aspergillus* de color marrón son más resistentes a la anfotericina B que *Aspergillus fumigatus*

Ana Alastruey-Izquierdo, Isabel Cuesta, Manuel Cuenca-Estrella
y Juan Luis Rodríguez Tudela

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

Objetivo. Analizar la actividad in vitro de nueve antifúngicos frente a las especies de *Aspergillus* de color marrón y compararla con la observada en *Aspergillus fumigatus*.

Métodos. Se analizaron 314 aislamientos clínicos de *Aspergillus* de color marrón recibidos en el servicio de micología del CNM-ISCIII entre los años 2000 y 2010. Se compararon los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) con los correspondientes a 871 cepas clínicas de *A. fumigatus* aisladas en los mismos años. Se identificaron por métodos clásicos y moleculares mediante la secuenciación de los espaciadores internos transcritos (ITS) y una parte del gen que codifica para la beta tubulina. Se estudió su perfil de sensibilidad a nueve antifúngicos siguiendo las directrices del método de referencia del AFST-EUCAST.

Resultados. Se identificaron 280 aislamientos de *Aspergillus terreus*, 22 de *Aspergillus alliaceus*, 7 de *Aspergillus ochraceus*, 3 de *Aspergillus sclerotiorum*, uno de *Aspergillus melleus* y uno de *Aspergillus westerdijkiae*. Las cepas de *Aspergillus* marrones mostraron altos valores de CMI in vitro a la anfotericina B comparados con los de *A. fumigatus*. Las CMI₅₀ (CMI que produce la inhibición del 50% de los aislamientos) y CMI₉₀ (CMI que produce la inhibición del 90% de los aislamientos) para la anfotericina B de los aislamientos de *A. fumigatus* fueron 0,25 mg/l y 0,5 mg/l, respectivamente. Los *Aspergillus* marrones tuvieron valores CMI₅₀ y CMI₉₀ > 8 mg/l en todas las especies analizadas, menos *A. terreus* (CMI₅₀ = 1 mg/l y CMI₉₀ = 4 mg/l) y el único aislamiento disponible de *A. westerdijkiae* (CMI = 2 mg/l). Entre los azoles, el posaconazol presentó buena actividad con

valores CMI50 y CMI90 < 1 mg/l para todas las especies analizadas. El voriconazol también mostró buena actividad con una CMI90 < 2 mg/l para todas las especies menos para *A. sclerotiorum* (CMI50 = 2 mg/l y CMI90 = 6,4 mg/l). Las equinocandinas fueron muy activas frente a todas las especies menos para *A. alliaceus* y *A. westerdijkiae* que presentaron altos valores de CMI a las 3 equinocandinas ensayadas.

Conclusiones. Los *Aspergillus* marrones tienen mayores valores de CMI a la anfotericina B que *A. fumigatus*. Los valores de CMI al posaconazol, el voriconazol y las equinocandinas de los *Aspergillus* marrones fueron comparables a las de *A. fumigatus*, pero algunas especies mostraron altos valores CMI in vitro a dichos antifúngicos. Una correcta identificación y la determinación del perfil de sensibilidad pueden ayudar de manera significativa a elegir el antifúngico más apropiado para el tratamiento y manejo de estas infecciones.

Modelo experimental de generación de mutantes resistentes a fluconazol y a caspofungina en *Candida* spp.

Ledicia Álvarez Paredes, Laura Soler Calatayud, Juan Carlos Rodríguez Díaz, Antonio José Galiana Cabrera, Sofía Belda Gas, Rosa Cremades González, Monserrat Ruiz-García, Pilar López García y Gloria Royo García

Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, España

Antecedentes. Debido a la elevada prevalencia de cepas resistentes a fluconazol en algunos ámbitos, se está considerando la posibilidad de utilizar caspofungina como alternativa en algunos pacientes.

Objetivos. Desarrollar un modelo in vitro de generación de mutantes con sensibilidad disminuida a fluconazol y a caspofungina en dos especies de levaduras (*Candida tropicalis* y *Candida glabrata*).

Métodos. Se utilizaron 4 aislamientos clínicos de *C. tropicalis* y 2 de *C. glabrata* provenientes de pacientes con fungemia. El estudio de la sensibilidad a la caspofungina y al fluconazol mostró que todas las cepas eran sensibles y estos resultados se confirmaron en el Instituto Carlos III (Majadahonda, Madrid). Generación de mutantes tras la exposición al fluconazol y caspofungina: cada aislamiento (104 ufc/ml) fue cultivado en Mueller Hinton con 2% de glucosa y cantidades variables de cada antibiótico (0,015; 0,125 y 1 mg/l). Un tubo sin antibiótico se utilizó como control. Después de 48 h de incubación, se realizó un subcultivo en las mismas condiciones y este proceso se repitió 25 veces. Además, se realizaron subcultivos en medio sólido y se determinó, mediante E-test, la sensibilidad de los mutantes generados.

Resultados. La exposición repetida a los antifúngicos estudiados ha generado mutantes con sensibilidad disminuida a estos fármacos, sobre todo tras la exposición a caspofungina. En *C. tropicalis* hubo una disminución de 3,9 veces en la sensibilidad al fluconazol y una disminución de 209 veces en la de la caspofungina; en *C. glabrata* la disminución de la sensibilidad fue de 44 veces al fluconazol y de 274 veces a la caspofungina. Ver tabla a pie de página.

Conclusiones. La caspofungina está emergiendo como un medicamento alternativo al fluconazol para el uso en algunos pacientes, ya que se ha demostrado repetidamente que tiene una gran actividad antifúngica. Sin embargo, nuestro modelo muestra también que existe el riesgo de generar mutantes con sensibilidad disminuida a esta, por lo que se debe optimizar los regímenes de administración (dosis,

intervalos, etc.) del fármaco para reducir la probabilidad de la aparición de resistencia.

Especies nuevas e interesantes de *Sarocladium* (*Acremonium*) procedentes de muestras clínicas

Alejandra Giraldo López, Josepa Gené Díaz, Josep Cano Lira y Josep Guarro Artigas

Institut D'Investigació Sanitaria Pere Virgili, IISPV, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Antecedentes. *Sarocladium* es un género anamorfo perteneciente a los *Hypocreales*, que actualmente contiene 11 especies. La mayoría de estos hongos son saprobios, encontrándose sobre material en descomposición y en el suelo; sin embargo, algunas especies son patógenas del hombre, animales y plantas. En base a estudios moleculares recientes se han transferido algunas especies de *Acremonium* al género *Sarocladium*, incluyendo especies de interés clínico, como *Acremonium kiliense* y *Acremonium strictum*. La posición de *Acremonium implicatum* no fue resuelta en dichos trabajos debido a la ausencia de cepa tipo y al escaso número de cepas de esta especie estudiadas.

Objetivos. Revisar la taxonomía de especies de *Sarocladium* de interés clínico.

Métodos. Se incluyeron en el estudio las cepas tipo de las especies que forman actualmente el género *Sarocladium* y todas las cepas de *A. implicatum* depositadas en diferentes colecciones internacionales de cultivos, además de algunas cepas de origen clínico reportadas en estudios previos. Se llevó a cabo un estudio polifásico detallado basado en el análisis de las secuencias de varios genes (la región ITS, los dominios D1-D2 de la subunidad 28S del ARN ribosomal y un fragmento del gen de la actina) y en la evaluación de sus caracteres fenotípicos. Para el análisis fenotípico las cepas se sembraron en diferentes medios de cultivo incubados a 25 °C y a su vez se determinaron las tasas de crecimiento a diferentes temperaturas.

Resultados. El análisis de secuencias multi-locus mostró la formación de varios clados con alto soporte estadístico. El clado 1 incluyó la mayoría de cepas de *A. implicatum* de origen clínico y algunas ambientales, además de la cepa CBS 243.59, descrita anteriormente como cepa tipo de *A. terricola*. El clado 2 estuvo formado por dos cepas, una de ellas originalmente identificada como *Monilia implicata* y una cepa de origen clínico identificada como *A. implicatum*. Separados del resto de las especies que forman el género, se encontraron los clados 3 y 4, formados por una y dos cepas, respectivamente. La cepa del clado 3 se caracterizó principalmente por colonias de crecimiento lento, conidióforos simples y ramificados y conidios fusiformes dispuestos en cabezas mucosas y cadenas. Las dos cepas del clado 4, similares entre ellas difieren de la anterior por la producción de esquizofálides y de conidios fusiformes de pared rugosa dispuestos en cadenas. El resto de cepas de *A. implicatum* estuvieron distribuidas a lo largo del árbol filogenético agrupándose con diferentes cepas tipo del género como *Sarocladium glaucum* o *S. ochraceum*.

Conclusiones. Se proponen dos nuevas denominaciones: *S. terricola* para aquellas cepas del clado 1, y *S. implicatum* para las del clado 2. Además, se describen dos nuevas especies para el género *Sarocladium* sp. 1 y *Sarocladium* sp. 2, que corresponden a los clados 3 y 4 respectivamente.

Tabla

	CMI día 0 (mg/l)		CMI día 5 (mg/l)		CMI día 10 (mg/l)		CMI día 15 (mg/l)		CMI día 20 (mg/l)		CMI día 25 (mg/l)	
	FL	CS	FL	CS	FL	CS	FL	CS	FL	CS	FL	CS
<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1)	0,027 (0,014)	0,83 (1,53)	0,03 (0,18)	1,26 (2,01)	0,032 (0,16)	1,51 (0,73)	0,35 (0,58)	1,55 (0,59)	5,62 (10,5)	1,98 (1,05)	5,65 (13,8)
<i>C. glabrata</i>	0,12 (0,18)	0,02 (0,017)	0,12 (0,18)	0,063 (0,04)	4,33 (1,41)	0,46 (0,40)	4,47 (0,70)	0,48 (0,36)	4,66 (0,94)	5,41 (7,5)	5,33 (0,94)	5,49 (7,53)

CS: caspofungina; FL: fluconazol.

Dermatofitos responsables de *tinea capitis* en Cádiz (España)

Pedro García-Martos, Lidia García-Agudo

y Manuel Rodríguez-Iglesias

Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario
Puerta del Mar, Cádiz, España

Antecedentes. La dermatofitosis más frecuente en la infancia es la llamada *tinea capitis*, que se presenta habitualmente a partir de los 5 años de edad. La emigración, los hábitos sociales y los viajes intercontinentales son responsables de los cambios en la distribución de la etiología en cada zona geográfica.

Objetivo. Con el fin de conocer las características de *tinea capitis* en Cádiz, revisamos los casos registrados en los últimos 14 años.

Métodos: Estudiamos a 41 pacientes diagnosticados microbiológicamente de *tinea capitis* de 1997 a 2010. A las muestras de estos pacientes se les realizó examen microscópico directo con KOH al 10% y cultivo en placas de agar de Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida incubadas a 30 °C durante 3 semanas. La identificación de los hongos se llevó a cabo según las características macro y microscópicas, siguiendo los criterios recomendados.

Resultados. En el período de estudio, se registraron un total de 339 casos de dermatofitosis. *Tinea capitis* supuso un 12% de ellas, con una tasa media de 1,2 casos/100.000 habitantes/año. La incidencia global osciló entre un 25% de casos en 1997 y el 3% en 2006. Todos los pacientes fueron menores de 12 años, 54% varones, 55% mayores de 7 años. El grupo etario donde se registró un mayor número de casos fue el de 7-10 años (51%). Solamente 3 pacientes eran extranjeros (7%): 2 magrebíes y un inglés. La concordancia entre el examen microscópico directo y el cultivo fue del 61%. Las especies responsables de *tinea capitis* fueron: 21 *Microsporum canis* (51%), 4 *Microsporum gypseum* (10%), 4 *Trichophyton mentagrophytes* (10%), 3 *Trichophyton violaceum* (7%), 3 *Trichophyton tonsurans* (7%), 3 *Trichophyton verrucosum* (7%), 1 *Trichophyton rubrum* (2%), 1 *Trichophyton schoenleinii* (2%) y 1 *Trichophyton soudanense* (2%).

Conclusiones. *Tinea capitis* mantiene en nuestra zona una incidencia baja con tendencia a disminuir. Es más frecuente en el sexo masculino y predomina entre los 7-10 años. Los casos importados suponen un escaso porcentaje. El examen microscópico directo presentó una baja sensibilidad con respecto al cultivo, aunque su positividad fue fundamental para establecer con certeza el diagnóstico. Las especies zoófilas fueron las más frecuentes, aunque también abundan las especies antropófilas que pueden transmitirse en el ámbito familiar y escolar, y las especies geófilas.

Queratitis fúngica por *Fusarium solani* en un modelo de experimentación animal. Resultados preliminaresManuel Sánchez¹, M. Emilia Mulet², Alejandra E. Rodríguez²,Antonio Sánchez¹, Laura Parra¹ y M. Francisca Colom¹¹Laboratorio de Micología, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España²Departamento de I+D+i, Visum Corporación Oftalmológica, Alicante, España

Antecedentes: Las queratitis infecciosas producidas por hongos —queratomycosis— son mayoritariamente de origen traumático, muy frecuentemente generadas por accidentes en los que elementos vegetales, polvo o tierra actúan como abrasivos y portadores del agente causal. Por tanto, especies saprofitas de vegetales y del suelo son los agentes causales más frecuentes en estos procesos. Entre estas, las especies del género *Fusarium* son las de mayor trascendencia, tanto por su frecuencia como por la elevada resistencia que estos hongos presentan a los antifúngicos de uso tópico convencional.

Por otra parte, los modelos experimentales de queratitis infecciosa son muy escasos y en general se basan en procedimientos muy agresivos para el animal de experimentación. Con frecuencia incluyen desepitelización corneal, tarsorrafia o ambas para facilitar la penetración y persistencia del hongo en tejido corneal.

Objetivos. El objetivo principal de este estudio ha sido desarrollar un modelo de infección corneal en conejos con el que poder testar nuevos antifúngicos específicos para el tratamiento de la queratomycosis. **Métodos.** Se utilizaron doce conejos de la variedad *White New Zealand*, divididos en dos grupos iguales, a los que se provocó una moderada inmunosupresión mediante la inyección de metilprednisolona 5 días antes, el día anterior y el día posterior a la inoculación. Además, se administró dexametasona tópica durante los 5 días posteriores a la inoculación.

El inóculo fúngico fue preparado mediante la coincubación en solución salina de conidias e hifas del hongo con micropartículas de madera de tamaño menor de 1 mm. Para el grupo 1 la coincubación fue de 1 h. Para el grupo 2 la coincubación fue de 5 días. Se aplicaron 50 ml de dicha mezcla vía intraestromal. A cada uno de los conejos se le inoculó un solo ojo, utilizándose el contralateral como control. El propágulo fúngico asociado a las partículas de madera, pretende emular el efecto de la inoculación traumática de estos hongos mediante accidentes en los que intervienen fragmentos vegetales portadores del hongo.

Resultados. El éxito experimental se definió como el índice de animales que presentaban al menos tres signos clínicos de queratitis fúngica durante más de una semana sin administración de inmunosupresores ni de actuaciones de otro tipo. El protocolo aplicado ofreció un éxito del 67% en el primer grupo de conejos y de un 85% en el segundo.

Conclusiones. El modelo de experimentación animal de queratomycosis por *Fusarium* es de fácil aplicación y menos agresivo para el animal que algunos de los que han sido propuestos en la literatura. El modelo puede ser válido para evaluar la eficacia terapéutica de nuevos fármacos, así como también para estudios de otros aspectos del proceso infeccioso.

Modelo experimental de generación de mutantes con sensibilidad disminuida a anfotericina B: caracterización de los mismos mediante la determinación de la actividad fungicida del fármaco

Leticia Álvarez Paredes, Laura Soler Calatayud,

Juan Carlos Rodríguez Díaz, Monserrat Ruiz-García,

Antonio José Galiana Cabrera, Rosa Cremades González,

Sofía Belda Gas, Pilar López García y Gloria Royo García

Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, España

Antecedentes. A pesar de la gran actividad in vitro de la anfotericina B frente a la mayoría de los aislamientos clínicos de *Candida albicans*, no siempre se logra una respuesta clínica favorable.

Objetivos. Conocer la disminución de la actividad fungicida del fármaco en mutantes generados tras exposición a condiciones subinhibitorias de este.

Métodos. Cepas estudiadas: 6 aislamientos clínicos de *Candida albicans* provenientes de pacientes con fungemia.

Generación de mutantes: los microorganismos se cultivaron en caldo Mueller-Hinton con 2% de glucosa y diferentes concentraciones de anfotericina (0,125, 0,25 y 1 mg/l). Un cultivo sin antibiótico se utilizó como control. Después de incubar durante 48 h a 37 °C se realizó un subcultivo en las mismas condiciones y este proceso se repitió 25 veces. Además, se realizó un subcultivo en agar glucosado de Sabouraud, estudiándose la sensibilidad de los mutantes generados mediante E-test. Como control de calidad, la sensibilidad de los 6 aislamientos clínicos fue confirmada por el Instituto Carlos III.

Determinación de la concentración mínima fungicida (MFC): se expusieron las cepas salvajes y los mutantes (104 ufc/ml) a diferentes concentraciones de anfotericina B (25, 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 mg/l) durante 1 y 24 h. Se consideró que el fármaco tenía actividad fungicida si había una reducción del crecimiento del 99,9% respecto al inóculo inicial.

Resultados. La exposición repetida a la anfotericina B dio lugar a una disminución de la sensibilidad a este medicamento. La CMI aumentó 5,25 veces, pero se mantuvo dentro del rango sensible de acuerdo con los criterios establecidos.

La actividad antifúngica de este compuesto se encuentra muy relacionada con el tiempo de exposición. Tras una corta exposición (1 h) es necesaria una concentración mayor de fármaco, tanto en cepas salvajes como mutantes, que en el caso de una exposición durante 24 h para lograr que el fármaco presente actividad fungicida.

Al comparar este parámetro en cepas salvajes y mutantes, observamos que es necesaria una mayor concentración del fármaco (15,5% tras 1 h de exposición y el 16,6% después de la exposición de 24 h) para lograr que el fármaco presente actividad fungicida frente a los mutantes.

	CMI (µg/ml)	Actividad antifúngica (1 h) (media)	Actividad antifúngica (24 h) (media)
Cepas salvajes	0,04	20	1,5
Mutantes a los 25 días	0,21	23,1	1,75

Conclusiones. Nuestros datos muestran que la exposición repetida a la anfotericina B causa una ligera reducción de la sensibilidad a este fármaco, que podría explicarse por un fenómeno de tolerancia a este. Por lo tanto, nuestro trabajo confirma la necesidad de administrar dosis suficientemente altas durante un período adecuadamente largo para destruir las levaduras en el sitio de la infección y prevenir la aparición de mutantes con sensibilidad disminuida.

Valoración de la presencia oral de *Candida* en pacientes con enfermedad cariogénica y periodontal

Janire De la Torre^{1,2}, M. Luisa Gainza^{1,2}, Elena Eraso¹,

Sandra Gil-Alonso¹, José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

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

²Unidad de Medicina Bucal, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

Antecedentes. *Candida* se aísla en la boca en una proporción significativa de personas donde se encuentra adherida a las superficies mucosas y dentales, como componente de la placa dental. Su participación en la etiología y patogenia de las enfermedades cariogénica y periodontal es controvertida, pero podría ser un cofactor importante en su evolución.

Objetivo. Analizar la colonización oral por las diferentes especies de *Candida* en los pacientes con patología cariogénica y/o periodontal y estudiar sus posibles relaciones con la gravedad de las lesiones.

Métodos. Se estudiaron las muestras clínicas orales de 74 adultos (45 mujeres) con una edad media de 43,89 años (rango 18-83 años), con o sin enfermedad cariogénica o periodontal. Los pacientes fueron clasificados en dos grupos según la presencia de enfermedad cariogénica o periodontal en función de los índices CPITN, o de la pérdida de inserción periodontal para la enfermedad periodontal (PIP), y el índice CAO para la enfermedad cariogénica. Los pacientes se distribuyeron en dos grupos: a) pacientes con patología moderada/grave (n = 48), y b) pacientes con patología leve o sanos (n = 26). Las muestras orales se sembraron en el medio cromógeno ChromID2 *Candida* (bioMérieux, Francia). El crecimiento se valoró a las 24, 48 y 72 h de incubación a 37 °C, realizándose posteriormente las lecturas cuantitativa y cualitativa del crecimiento fúngico. Las colonias de color azul turquesa se sembraron en agar glucosado de Sabouraud y se confirmó su identidad mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida africana*. Las colonias blancas también se sembraron en agar Sabouraud y se procedió a su identificación por métodos mico-

lógicos convencionales que incluían la morfología microscópica en agar harina de maíz, la producción de tubo germinal en suero y la asimilación de fuentes de carbono (API ID32C, bioMérieux, Francia).

Resultados. *Candida* se aisló en las muestras orales de 40 pacientes (54,05%): 28 pacientes del grupo 1 (58,3%) y 12 del 2 (46%). En los 28 pacientes del grupo 1, se aislaron 21 *C. albicans* (75% de los pacientes), 3 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida lypholitica*, 2 *Candida glabrata*, 2 *Candida tropicalis*, y un aislamiento de las especies *C. dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* y *Candida inconspicua*-*Candida norvegensis*. En los 12 pacientes del grupo 2, se identificaron 11 *C. albicans* (91,6% de los pacientes), 2 *C. parapsilosis* y 1 *C. famata*. Se obtuvieron cultivos mixtos en 4 pacientes del grupo 1 y en un paciente del grupo 2. *C. albicans* estuvo presente en casi todas las combinaciones. Nueve pacientes del grupo 1 (32,14%) y 5 pacientes del grupo 2 (41,6%) presentaron aislamientos con más de 50 UFC.

Conclusiones. Se aisló *Candida* en la cavidad oral de más de la mitad de los pacientes con patología cariogénica y periodontal pero no había diferencias significativas de colonización, número de colonias o presencia de cultivos mixtos entre los dos grupos. Los pacientes con patología más grave presentaban una mayor diversidad de especies de *Candida*.

Financiación: Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco) y S-PR10UN03 (Saiotek 2010, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco).

Prevalencia y sensibilidad a los antifúngicos de las nuevas especies crípticas agrupadas en los complejos *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*

Ilargi Miranda-Zapico¹, Elena Eraso¹, José Luis Hernández-Almaraz²,

Leyre Mónica López-Soria², Alfonso Javier Carrillo-Muñoz³,

Juan Manuel Hernández-Molina⁴ y Guillermo Quindós¹

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

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

³ACIA-Microbiología, Barcelona, España

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

Antecedentes. Hoy en día existe escasa información sobre la sensibilidad a los antifúngicos y la relevancia clínica de especies crípticas como *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*.

Objetivos. Evaluar la prevalencia y la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* en 173 aislamientos de sangre previamente identificados como *Candida glabrata* o *Candida parapsilosis* del Hospital de Cruces (Barakaldo) y en 518 aislamientos clínicos de la colección de la Universidad del País Vasco (UPV, Bilbao).

Métodos. Todas las cepas habían sido identificadas como *C. parapsilosis* y *C. glabrata* por métodos convencionales. *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* fueron identificadas por amplificación de ADN seguido de AFLP según el método descrito por Tavanti et al (J Clin Microbiol. 2005;43:284-92). Brevemente, se amplificó una región de 716 pb del gen SADH (alcohol deshidrogenasa secundaria) y se digirió con la enzima *BanI*. *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* contienen uno, tres y ningún espacio de restricción, respectivamente. La identificación de *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* se realizó mediante una PCR múltiple basada en la amplificación de la región ITS1, con cebadores reversos específicos para *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* y el cebador inverso UNI-5.8S que amplifica la región 5.8S del ADNr (Romeo et al. J Microbiol Methods. 2009;79:117-20). Además, se estudió la sensibilidad in vitro a la 5-fluorocitosina, la anfotericina B, la anidulafungina, la caspofungina, el fluconazol, el itraconazol, la micafungina, el posaconazol y el voriconazol.

conazol mediante el método comercial Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, EE. UU.).

Resultados. Todos los aislamientos de *C. glabrata* fueron identificados como *C. glabrata sensu stricto*. Dentro del complejo *C. parapsilosis*, un 2,4% de los aislamientos del Hospital de Cruces y el 5,8% de los de la UPV fueron identificados como *C. metapsilosis* o *C. orthopsilosis*. De los 457 aislamientos, 435 (95,19%) se identificaron como *C. parapsilosis sensu stricto*, 11 (2,41%) como *C. metapsilosis* y 11 (2,41%) como *C. orthopsilosis*. Únicamente 7 aislamientos de sangre fueron *C. metapsilosis* (0,44%) o *C. orthopsilosis* (1,09%). Las especies crípticas también fueron aisladas en otras muestras clínicas relevantes. Dos *C. parapsilosis sensu stricto* (2,8%) fueron sensibles, dosis-dependientes o resistentes al fluconazol. El itraconazol fue el menos activo de los azoles y fue necesaria una concentración más elevada de las equinocandinas para inhibir a *C. parapsilosis sensu stricto*. La mayoría de los aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron sensibles a todos los antifúngicos probados, pero una cepa de *C. metapsilosis* fue resistente a fluconazol y 5-fluorocitosina.

Conclusiones. *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* causan candidiasis sistémicas y superficiales y muestran perfiles diferentes de sensibilidad a los antifúngicos.

Financiación. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos GIC07 123-IT-222 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco), S-PR09UN01 y S-PR10UN03 (Saiotek 2009 y 2010, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco).

Tinea pedis interdigital de difícil diagnóstico etiológico

Lidia García-Agudo¹, Manuel Rodríguez-Iglesias², Josepa Gené³, Cristina Valladares⁴ y Pedro García-Martos²

¹Hospital de Tomelloso, Tomelloso, Ciudad Real, España

²Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España

³Facultad de Medicina, Universidad Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

⁴Centro de Salud Loreto-Puntales, Cádiz, España

Antecedentes. *Tinea pedis* es la micosis cutánea superficial más frecuente. *Trichophyton rubrum* es el agente etiológico más habitual. No obstante, otros agentes pueden estar implicados: *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, especies de *Candida*, y ocasionalmente hongos filamentosos no dermatofitos, como *Scytalidium hyalinum* y *Scytalidium dimidiatum*. Presentamos un caso de *tinea pedis* en un adulto sano, sin factores predisponentes, cuyo diagnóstico etiológico resultó complicado.

Caso clínico. El paciente es un hombre sano de 50 años, sin antecedentes de interés, jubilado. Refiere trabajar eventualmente en el campo como bateador en cacerías de perdices. Consulta por lesiones de más de un año de evolución en todos los espacios interdigitales de los dedos de ambos pies que le causan prurito o sensación de quemazón. En la exploración se aprecia la piel macerada de aspecto blanquecino-amarillento, algo agrietada, escasamente dolorosa, con descamación. El examen microscópico de las escamas con KOH al 20% permitió observar hifas hialinas tabicadas gruesas, distorsionadas, artrosporadas. En el cultivo en placas de agar de Sabouraud con cloranfenicol con y sin cicloheximida, incubadas a 30 °C, se apreció crecimiento a los 3 días de abundantes colonias pequeñas, de color amarillo-pálido, borde irregular, superficie aterciopelada, y reverso de color amarillo intenso. A los 7 días las colonias tenían un tamaño de casi 1 cm y presentaban en el reverso una tonalidad parda. Al microscopio se identificaron hifas septadas, macroconidias cilíndricas de 2-6 septos, estrechadas bruscamente hacia la base. No se observaron microconidias. De acuerdo con estas características, se identificó presuntivamente al hongo como *Trichophyton flavescens*. El estudio del hongo en la unidad de micología de la Facultad de Medicina de Reus (Tarragona), mostró que la micromorfología de los cultivos se parecía a la de *Epidermophyton floccosum*. La cepa desarrolló macroconidias en ramillete y clamidosporas, aunque también produjo estructuras atípicas.

Como el color amarillo de las colonias también puede aparecer en *Epidermophyton*, para establecer la identificación definitiva se realizó amplificación y secuenciación de las regiones ribosomales D1/D2 e ITS, constatando un 99% de similitud con secuencias de *E. floccosum* de cepas fiables depositadas en el Genbank. Tras este hallazgo, se confirmó que se trataba de una cepa morfológicamente atípica de *Epidermophyton floccosum*, pero genéticamente compatible.

Conclusiones. La localización y la apariencia de las lesiones permiten sospechar el diagnóstico clínico de *tinea pedis*. El cultivo es capaz de dar un diagnóstico específico de acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas de las colonias, pero en los aislamientos atípicos las técnicas genéticas son imprescindibles para poder establecer el diagnóstico etiológico correcto.

Importancia de la infección mixta por especies de Candida en la candidiasis oral

Cristina Marcos-Arias¹, Elena Eraso¹, Marcelo Ortega-Riveros¹, Aketza Varona¹, Sandra Gil-Alonso¹, Ilargi Miranda-Zapico¹, José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

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

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

Antecedentes. La candidiasis oral es una causa frecuente de malestar oral que puede tener complicaciones como una candidiasis esofágica. *Candida albicans* es generalmente el principal agente etiológico aunque otras especies de *Candida* pueden estar implicadas.

Objetivos. Describir la frecuencia y tipo de infección mixta por *Candida* en la candidiasis oral.

Métodos. Se estudiaron 233 muestras de pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco con candidiasis oral desde el año 2008 hasta el año 2011. Las muestras se recogieron de las lesiones mediante torundas y se cultivaron durante 48 h a 37 °C en los medios cromógenos ChromID *Candida* (bioMérieux, Francia) y *Candida* Chromogenic Agar (Conda, España). La identificación de los aislamientos clínicos se realizó por métodos micológicos convencionales y, en los casos necesarios, se confirmó la identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de especie.

Resultados. Se aisló una única especie en 122 de 233 muestras (52,4%); en este grupo, *Candida albicans* fue la especie más frecuente, estando presente en 111 de las 122 muestras (91%); *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Candida guilliermondii* estaban presentes en 4 (3,3%), 3 (2,5%) y 2 (1,6%) muestras de 122, respectivamente, y *Candida dubliniensis* y *Saccharomyces cerevisiae* se aislaron en una muestra de 122 (0,8%). Además, no se aisló *Candida tropicalis* en ninguna de las muestras de este grupo.

En 58 de las 233 muestras (24,9%) no se aislaron levaduras, mientras que en 53 muestras (22,7%) se observó colonización mixta por dos o más especies de *Candida*. En estas muestras se observaron 12 tipos de combinaciones, siendo la formada entre *Candida albicans* y *Candida glabrata* la más frecuente (24 de 53, 45,3%), seguida por *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, y por *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* (ambas en 9 de 53 muestras, 17%). Se obtuvo una muestra (1,9%) de cada una de las siguientes combinaciones: *Candida albicans* y *Candida lusitanae*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida pelliculosa* y finalmente, *Candida parapsilosis* y *Candida rugosa*. Se observaron combinaciones triples, de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* y de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, en 2 de las 53 muestras (3,7%) y de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* en una muestra (1,9%).

Se comparó el número de UFC obtenidas en muestras con cultivo único o mixto y no se encontraron diferencias significativas.

Conclusiones. *Candida albicans* es la especie que se aísla con más frecuencia en la candidiasis oral y a menudo aparece junto con otras especies de *Candida*, siendo la asociación más frecuente la formada entre *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Aunque la frecuencia de una sola especie es mayor, se ha observado que el 22,7% de los pacientes con candidiasis oral padecen una infección mixta.

Financiación. Proyectos GIC07 123-IT-222-07 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco) y S-PR10UN03 (Saiotek 2010, Departamento de Industria, Comercio y Turismo, Gobierno Vasco).

Escudosporios pulmonar en paciente con trasplante no emparentado de progenitores hematopoyéticos

M. del Carmen Martínez Jiménez, Buenaventura Buendía Moreno, Alba Guiu Martínez y Manuel López-Brea Calvo

Sección de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España

Antecedentes. El género *Scedosporium* tiene hongos filamentosos ambientalmente ubicuos. Los principales patógenos son *Scedosporium apiospermum* —asexual de *Pseudallescheria boydii*— y *Scedosporium prolificans*. Histológicamente pueden confundirse con *Aspergillus* spp.

La escudosporios pulmonar cursa de manera similar a la aspergilosis: desde la colonización del tracto respiratorio a la hipersensibilidad broncopulmonar alérgica, formación de una bola fúngica en una cavidad preexistente e invasión pulmonar, o escudosporiosis diseminada. La presentación clínica más común es la fiebre. Radiológicamente, es indistinguible de la aspergilosis pulmonar invasiva, y al no existir criterio patognomónico para la escudosporiosis, el diagnóstico confirmatorio es el histológico y el microbiológico.

Caso clínico. Mujer de 51 años diagnosticada de síndrome mielodisplásico tipo AREB-II secundario LAMM5b que fue sometida a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos autólogo (2009) y de donante no emparentado (2010). Ingresó por neutropenia febril. Presentó una aplasia muy prolongada cuya consecuencia fue una pancitopenia muy marcada. Un absceso pulmonar fue la principal complicación. Se solicitó fibrobroncoscopia y punción-aspiración con aguja fina (PAAF). No hubo hallazgos microbiológicos.

A los 2 meses presentó un síndrome febril con infección pulmonar sin respuesta a antibióticos en el contexto de TPH. En la tomografía computarizada (TC) torácica apareció una lesión de 2 cm de diámetro en el segmento 6 del LID pulmonar. Se cambió el tratamiento antifúngico a voriconazol. En la segunda fibrobroncoscopia se observó una masa amarillenta en el segmento subsegmentario compatible con una bola fúngica. En el estudio histopatológico se describe la presencia de hifas tabicadas. Se añade anfotericina B liposomal al tratamiento. El análisis microbiológico fenotípico sugiere como agente etiológico *Scedosporium apiospermum*, confirmándose genotípicamente por PCR (ITS, B-Tubulina) en el Centro Nacional de Referencia de Majadahonda, donde también se testó la sensibilidad por el método de microdilución en caldo.

Hasta la obtención de los valores de sensibilidad a los antifúngicos se modificó el tratamiento: voriconazol + terbinafina. Finalmente se dejó a la paciente solo con voriconazol (200 mg/12 h). En sucesivos TC torácicos se observó un nódulo pulmonar de 3 cm de diámetro en LID. Se programó lobectomía del LID (segmento 6). Las piezas quirúrgicas (exudado bronquial y biopsia pulmonar) se enviaron a anatomía patológica y a microbiología, con el resultado final de *Scedosporium apiospermum*.

Resultados. Diagnóstico por imagen (TC de tórax): nódulo pulmonar en segmento 6, LID, entre 2 y 3 cm de diámetro. Anatomía patológica: infección micótica localizada en lesión cavitada con extensión focal a estructuras bronquiales adyacentes sin invasión del parénquima pulmonar. Estructuras micóticas septadas y ramificadas en ángulo

agudo. Microbiología: KOH y calcoflúor: estructuras fúngicas de hifas septadas y ramificaciones en ángulo agudo. Estructuras compatibles con conidióforos y conidias típicas de *Scedosporium* spp. Cultivo: agar glucosado de Sabouraud y agar dextrosa patata (temperatura de 30 °C). Se obtuvieron colonias, blanco-grisáceas de aspecto algodonoso y reverso amarillo pálido o marrón oscuro. Tinción con azul de lactofenol: conidias ovales que surgen de anélices ramificadas o solitarias. Conidióforos formados por anélices largos y finos. Sensibilidad: itraconazol: > 8 µg/ml, posaconazol: 2 µg/ml, caspofungina: > 16 µg/ml, terbinafina: > 16 µg/ml, anfotericina B: > 16 µg/ml, voriconazol: 0,5 µg/ml (intervalos establecidos por el CLSI: anfotericina B: 4-16 µg/ml; voriconazol: 0,5-2 µg/ml; posaconazol: 1-4 µg/ml).

Conclusiones. La enferma adquirió la infección en un período de neutropenia prolongada. La resolución conlleva un diagnóstico precoz, desbridamiento quirúrgico y tratamiento antifúngico adecuado. La coordinación de los especialistas en el diagnóstico por imagen, análisis histopatológicos y análisis microbiológicos es imprescindible, así como el conocimiento de los factores de riesgo propios del paciente.

Diagnóstico de infección sistémica por *Histoplasma capsulatum* en paciente VIH positivo desconocedor de esta situación

Cristina Esteban Redondo, Yuliya Zboromyrska, Manel Almela Prades, Frances Marco Reverté, Jordi Vila Estapé y Jorge Puig de la Bellacasa Brugada

Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España

Antecedentes. La histoplasmosis es una micosis emergente en España. Los pacientes inmunocompetentes suelen desarrollar un cuadro pulmonar de curso crónico y presentan el antecedente de un viaje a zonas endémicas. Los pacientes inmunodeprimidos, en la mayoría de los casos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), presentan una histoplasmosis diseminada progresiva y son originarios de zonas endémicas.

Objetivos. En este trabajo combinamos el uso de pruebas clásicas y moleculares para detectar e identificar en 3 días *Histoplasma capsulatum* como agente causal de infección fúngica diseminada en un paciente con primoinfección por el VIH.

Paciente y métodos. Varón de 35 años, transexual, originario de Colombia, que vive en España desde hace 3 años. Consulta en urgencias de nuestro hospital por fiebre durante 24 h, además de astenia, pérdida de peso y sudoración nocturna desde hace 2 meses. Presenta aumento de marcadores inflamatorios. La radiografía de tórax evidencia un patrón miliar bilateral. Se orienta el caso como posible tuberculosis miliar y sobreinfección bacteriana. Se inicia tratamiento empírico con tuberculostáticos y se solicitan pruebas microbiológicas: serología urgente combinada para el VIH (antígeno p24 y anticuerpos para VIH1 y 2 por ELISA), virus hepatotropos, VDRL, antígeno para *Cryptococcus neoformans*, reacción intraepidérmica de Mantoux y ELI-SPOT TBC. Se realizan hemocultivos para microorganismos comunes y micobacterias, urocultivo y fibrobroncoscopia con lavado broncoalveolar (LBA) de lóbulo medio para la detección de microorganismos comunes, micobacterias, hongos, virus y *Pneumocystis jirovecii*, y muestra de esputo post-LBA.

Resultados. La serología para el VIH fue positiva, con una carga viral de 107.000 copias ARN/ml. Los hemocultivos y cultivos de heces y orina fueron negativos, así como la prueba ELI-SPOT, Mantoux, VDRL y la detección de antígeno de *C. neoformans*. Del lavado broncoalveolar resultan negativos los cultivos para gérmenes comunes, PCR para micobacterias, antígenos y PCR para CMV, VEB, VHS-1 y 2 y virus respiratorios.

En el examen directo con tinción de Gram de la muestra de esputo se observan abundantes levaduras. El LBA se prepara por citocentrifugación y se realiza tinción de plata, que descarta la presencia de *P. jirovecii*. En todos los casos se observa la presencia de levaduras intra y extracelulares, en algunos casos con gemación, que presentan un halo de exclusión.