



VI Fórum Micológico

Asociación Española de Micología (AEM)

PROGRAMA CIENTÍFICO

9:00 – 9:10 h. Saluda.

Ferran Sánchez-Reus

(Coordinador de la Sección de Micología Médica de la AEM) y
Guillermo Quindós (Presidente de la AEM)

9:15 – 10:30 h. SESIÓN CIENTÍFICA

“Nuevos antifúngicos”

Nuevas moléculas antifúngicas.

Jesús Guinea.

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

El quitosano como antifúngico: modo de acción

Luis Vicente López-Llorca.

Catedrático de Universidad.

Director del Instituto Multidisciplinar de Estudios del Medio Ambiente Ramón Margalef.
Universidad de Alicante. Alicante

10:30 – 11:00 h. Pausa café

11:00 – 13:30 h. COMUNICACIONES ORALES

13:30 – 15:00 h. Comida

15:15 – 16:30 h. TALLER PARA JÓVENES CIENTÍFICOS

Cómo preparar un artículo científico.

Guillermo Quindós

Editor de la Revista Iberoamericana de Micología.
Catedrático de Microbiología. Facultad de Medicina y Odontología,
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Bilbao

Cómo preparar un proyecto de investigación.

Emma Benlloch

Directora de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI)
de la Universidad Miguel Hernández (UMH). Alicante.

16:30 – 17:00 h. Pausa café

17:00 – 19:00 h. COMUNICACIONES ORALES

19:00 – 19:15 h. Conclusiones y clausura.

Ferran Sánchez-Reus y Guillermo Quindós

CENA DE CLAUSURA



Ponencias

Nuevas moléculas antifúngicas

Jesús Guinea

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas.

Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid, España

Correspondencia: Jesús Guinea. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Gregorio Marañón. C/ Dr. Esquerdo Nº48. 28007 Madrid. Teléfono: +34 915867163. E-mail: jguineaortega@yahoo.es

Los pacientes con infecciones fúngicas invasoras (IFI) presentan una elevada mortalidad. Los antifúngicos comercializados para el tratamiento de las IFI actúan interfiriendo con la integridad de la membrana celular (azoles, alilaminas, y polienos), la integridad de la pared celular (equinocandinas), o inhibiendo la síntesis de ADN (análogos de pirimidinas). Estos agentes presentan limitaciones en cuanto a su reducido espectro de actividad, la emergencia de aislados resistentes a antifúngicos, sus características farmacocinéticas y toxicidad, o por su moderada eficacia clínica. Estas restricciones, junto con el incremento en el número de casos de IFI, son bases suficientes para la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos.

En los últimos años se ha desvelado la actividad antifúngica de diversas moléculas frente a hongos de interés clínico. Algunas de ellas son drogas que se han usado para el manejo de enfermedades diferentes a las IFIs; por ejemplo, los nuevos quelantes del hierro, como el deferasirox, actúan secuestrando el hierro directamente desde las moléculas encargadas de transportar este ión en las células fúngicas. El hierro es esencial para la supervivencia del hongo y los bajos niveles intracelulares de Fe³⁺ conducen a la muerte celular. El deferasirox ha mostrado actividad antifúngica frente a cepas clínicas de Mucorales y *Aspergillus*, y ha sido usado como coadyuvante para el tratamiento de la zigomicosis o aspergilosis invasora. Las estatinas son agentes hipolipidemiantes que interfieren con la síntesis de colesterol en el humano; estos agentes juegan un papel importante en la inhibición de la síntesis de ergosterol en los hongos. Las estatinas han demostrado actividad antifúngica in vitro frente a *Candida*, Mucorales, *Aspergillus*, y *Cryptococcus*. El ibuprofeno, conocido por su efecto analgésico, tiene actividad in vitro frente a cepas clínicas de *Candida* resistentes a fluconazol.

Por otro lado, muchos otros agentes han sido específicamente desarrollados para demostrar actividad antifúngica. Aminosteroles, ácidos grasos acetilénicos, péptidos, anticuerpos, e inhibidores de la isoleucil-tRNA sintasa son parte de un heterogéneo grupo de moléculas con potencial para convertirse en antifúngicos en el futuro.

El quitosano como antifúngico: modo de acción

Chitosan as antifungal: Mode of action

Luis V. Lopez-Llorca*, Federico Lopez-Moya,

Almudena Aranda-Martinez

Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada,

Instituto Multidisciplinar para Estudios del Medio (IMEM) Ramon Margalef, Universidad de Alicante, E-03080 Alicante

*Correspondencia: Luis V. Lopez-Llorca. Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Instituto Multidisciplinar para Estudios del Medio (IMEM) Ramon Margalef, Universidad de Alicante, E-03080 Alicante., Teléfono: +34 965903400 ext. 3381 Fax: + 34 965909897. E-mail: lvlopez@ua.es

Introduction. Chitosan is a polymer of glucosamine obtained by partial chitin N-Deacetylation. Commercial chitosan is mainly obtained by chemical deacetylation of crustacean chitin from shellfish wastes but can also be produced by microbial/enzymatical methods. The positive charge of chitosan confers of numerous and unique physiological and biological properties to this polymer, with great potential in a wide range of industries such as pharmacology, medicine and agriculture. These are favoured by the fact that chitosan is non-toxic to mammals. Chitosan has antimicrobial properties and antifungal activity in particular.

Objectives. The main aim of this presentation is to revise the research carried out in our laboratory on the mode of action of chitosan as an antifungal. Key factors related with the cell and molecular targets of chitosan are discussed.

Methods. Several approaches to gather information on the mode of action of chitosan on several fungi (including model/pathogenic filamentous fungi and yeast) have been used. Cultural methods have ranged from petri dish or germination tests. Flow cytometry or multiwell plate reader have been used for assessing chitosan driven membrane permeabilisation and the effect of chitosan on fungal growth kinetics. Microscopy (confocal, electronic, fluorescence) has been used determine the cell targets of chitosan. Tests including mammalian cells or model invertebrate hosts for assesing the efect of chitosan on fungus virulence have been also used. Finally chemogenomics and transcriptomics have been used to determine the putative gene cell targets of chitosan.

Results. We have found that chitosan permeabilizes the fungal plasma membrane in an energy dependent manner. Our preliminary differential of effect of chitosan on fungi (many important fungal pathogens are sensitive to chitosan whereas other fungi

are not) led us to discover that membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. We have found using proteomics that chitosan modifies the expression of proteins of filamentous fungi vs. growth on chitin (its acetylated form). Using chemogenomics and transcriptomics we have recently found that chitosan modifies the pattern of gene expression and affects strains differentially depending on their genetic background. Interestingly we have found that the gene targets of chitosan are different from those of other antifungals acting on the plasma membrane. To this respect chitosan is synergic with antifungals such as fluconazole and others. We have recent evidences that the nutrient status (C-content) deeply affects the activity of chitosan and that reactive oxygen species are involved. Finally, the cell wall together with the plasma membrane influence the antifungal action of chitosan.

Conclusions. Chitosan is a promising compound to be developed as antifungal for clinical use alone or in combination with currently used antifungals. Our present results on its mode of action and those in progress will help to improve its antifungal potential.

Cómo preparar un artículo científico

Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica (UFI11/25), Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao

Correspondencia: Guillermo Quindós. Laboratorio de Micología Médica (UFI11/25), Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Apartado 699, 48080 Bilbao. Guillermo.Quindos@ehu.es

Escribir un artículo científico no es una empresa fácil, ni siquiera para aquellos que han publicado repetidas veces sus investigaciones en distintos foros impresos o electrónicos. Parafraseando a Alex Paton, excepto para unos pocos afortunados que parecen haber nacido con ese don, la capacidad de escribir se va haciendo poco a poco, a base de esfuerzos y sufrimiento. Afortunadamente para los que escribimos en revistas de Micología, Microbiología o Infectología, hay una serie de guías y normas que en mayor o menor medida son seguidas por la mayoría de las revistas científicas relevantes. A pesar de los muchos consejos que podamos recibir de nuestros colegas, nadie nos librará de este reto y de padecer mientras lo afrontamos.

El objetivo principal será transmitir algunas experiencias y consejos que faciliten la escritura de un artículo científico a todos aquellos

investigadores que se enfrentan por primera vez a este importante reto.

En esta charla podremos valorar las distintas razones que nos pueden llevar a desear publicar nuestros resultados. También veremos los diferentes tipos de publicación científica que nos permiten acomodar mejor nuestro trabajo, el estilo más habitual de escritura científica y observaremos la estructura básica, con los apartados casi obligatorios, de toda publicación científica. Además discutiremos algunos puntos sobre la idoneidad de la publicación, la ética de publicar y los problemas asociados al procesado editorial de las publicaciones.

A modo de conclusiones, podemos destacar que la escritura de un artículo científico implica, por una parte, leer de forma permanente las publicaciones de aquellos que trabajan en nuestra área y áreas afines de la Ciencia para aprender y que nuestro conocimiento se encuentre actualizado y, por otra, seguir aquellas normas y pautas aceptadas en las revistas científicas que permitan que lo que deseamos transmitir a los lectores se realice de una manera adecuada y con los mayores estándares de calidad, legibilidad y difusión.

Algunas claves y recomendaciones para la preparación de proyectos de I+D+I

Mariano Almela Alarcón

Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI), Universidad Miguel Hernández de Elche

Correspondencia: Mariano Almela Alarcón. OTRI. Universidad Miguel Hernández de Elche. Edificio Rectorado y Consejo Social. Avda. de la Universidad s/n. 03202 ELCHE. España. Teléfono: +34 966658733. Fax: +34 966658666. E-mail: m.almela@umh.es

El planteamiento de esta ponencia está específicamente orientado a repasar los principales aspectos que es preciso tener en cuenta para la elaboración de proyectos de I+D+I, principalmente basándonos en el esquema general de un proyecto europeo, que suele estructurarse en los apartados siguientes:

- a. Planteamiento de la propuesta: planificación, estructuración y adecuación a los contenidos de la convocatoria.
- b. Objetivos, estado del arte y plan de trabajo.
- c. Mecanismos de gestión que faciliten la implementación del proyecto. Organización de la cooperación en proyectos con varios participantes.
- d. Impacto del proyecto. Beneficios científico-técnicos, económicos, sociales, medioambientales, etc. Medidas para la protección de resultados y para su difusión. Planes de explotación.

Se ofrecerán algunas recomendaciones prácticas, obtenidas a partir de la experiencia disponible en la elaboración y evaluación de este tipo de proyectos.



Comunicaciones

Evaluación del efecto del dimetil sulfóxido en la susceptibilidad de *Caenorhabditis elegans* a diferentes especies de *Candida*

Juan Daniel Cartón, Marcelo Ortega-Riveros, Iker De-la-Pinta*, Elena Eraso y Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica (UFI11/25), Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao

*Correspondencia: Iker De-la-Pinta. Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa (Bizkaia). Teléfono: +34 94 601 5675. Fax: +34 94 601 3495

Antecedentes. El dimetil sulfóxido (DMSO) se utiliza en las pruebas de sensibilidad in vitro como diluyente de los fármacos antifúngicos insolubles en agua. Sin embargo, este compuesto orgánico atraviesa fácilmente las membranas celulares y los tejidos y puede inducir la formación de poros y la desorganización de las membranas del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Objetivo. Evaluar el efecto del DMSO en la historia natural de la infección experimental de *Caenorhabditis elegans* por diferentes especies *Candida*.

Métodos. Se infectaron 1.000 *C. elegans* con siete cepas distintas de *Candida*: *Candida albicans* NCPF 3153, *Candida dubliniensis* NCPF 3949, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida metapsilosis* ATCC 96143, *Candida orthopsilosis* ATCC 96139 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Los nematodos se incubaron a 25°C en una microplaca con medio M9 (suplementado con 90 µg/ml de kanamicina y 10 µg/ml de colesterol en etanol). Los *C. elegans* infectados se repartieron en dos grupos, en uno de ellos la incubación se realizó en presencia de 1% de DMSO. El efecto del DMSO sobre la susceptibilidad de *C. elegans* a la infección por las distintas especies de *Candida* fue evaluado estudiando la supervivencia de los nematodos cada 24 h durante 6 días. La comparación se realizó mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y la estimación de las diferencias entre ellas se obtuvo con la prueba log-rank y el test de Wilcoxon utilizando el programa SPSS 15.0.

Resultados. La mortalidad de los nematodos infectados por *C. albicans*, *C. krusei* y *C. metapsilosis* fue similar en los grupos incubados con y sin DMSO ($p=0,652$, $p=0,195$ y $p=0,092$, respectivamente). Sin embargo, la mortalidad de los nematodos infectados por *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* fue significativamente mayor en el grupo incubado con DMSO ($p < 0,05$) (Figura 1). Las distintas especies de *Candida* se pueden ordenar del siguiente modo de acuerdo con su virulencia en el medio libre de DMSO: *C. albicans* > *C. krusei* > *C. metapsilosis* ≈ *C. orthopsilosis* > *C. parapsilosis* ≈ *C. glabrata* > *C. dubliniensis*. Sin embargo, en el medio con DMSO este orden era ligeramente diferente: *C. albicans* > *C. metapsilosis* ≈ *C. krusei* ≈ *C. orthopsilosis* ≈ *C. parapsilosis* ≈ *C. dubliniensis* > *C. glabrata*.

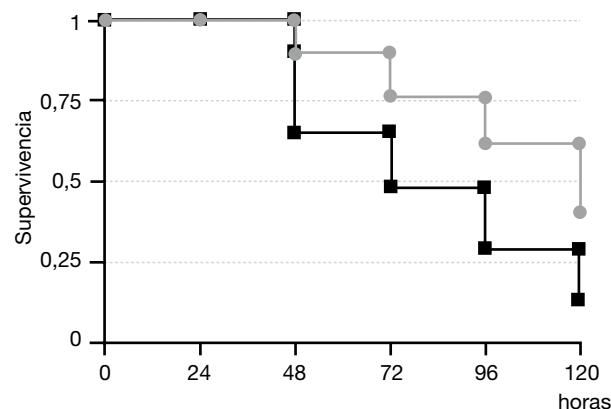


Figura 1. Supervivencia acumulada de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida* parapsilosis en un medio con agua (gris) y en un medio con DMSO (negro)

Conclusiones. La adición del DMSO en el medio aumenta la susceptibilidad de los nematodos a la infección. Las especies *C. albicans*, *C. krusei* y *C. metapsilosis* son las más virulentas en este modelo experimental alternativo.

Financiación. Este estudio ha sido financiado en parte por los proyectos PI11/00203 (FIS, Gobierno de España), GIC12 210-IT-696-13, S-PR12UN002 y S-PR11UN003 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza).

Evaluación de la eficacia de la anfotericina B en combinación con posaconazol en un modelo murino de aspergilosis diseminada

Adela Martín, Javier Capilla, Katiuska Paredes, Josep Guarro*

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

*Correspondencia: Prof. Josep Guarro. Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, URV, Reus, España. Teléfono: +34 977759359. Fax: +34 977759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

Antecedentes. Las especies de *Aspergillus* son responsables del 90% de las infecciones por hongos filamentosos, siendo *A. fumigatus* la especie de mayor incidencia clínica con tasas de mortalidad que oscilan entre un 35 y un 95%. Actualmente, la terapia de elección para el tratamiento de la aspergilosis invasora se basa en la utilización del voriconazol, sin embargo, se ha observado un aumento en el número de aislados resistentes o con reducida sensibilidad a los azoles. Las combinaciones de antifúngicos pueden representar una opción terapéutica para aquellas infecciones causadas por cepas resistentes al tratamiento recomendado.

Objetivos. Evaluar la eficacia *in vivo* de la anfotericina B (AMB) combinada con posaconazol (PSC) en un modelo murino de infección diseminada por *A. fumigatus*.

Métodos. Se ensayaron dos cepas de *A. fumigatus*. Se utilizaron ratones OF-1 inmunosuprimidos que fueron infectados con inóculos de conidios capaces de causar la mortalidad de los animales entre los días 6 y 7 post-infección. Para la cepa FMR 10528 se utilizó un inóculo de 1×10^4 UFC/animal y para la cepa FMR 13142 uno de 1×10^3 UFC/animal. Los animales recibieron 0.8 mg/kg de AMB i.v. o 40 mg/kg de PSC administrado oralmente BID o la combinación de ambos fármacos. Todos los tratamientos se iniciaron 24 h después de la infección y se prolongaron durante 7 días. La eficacia de las terapias fue evaluada mediante el análisis de la supervivencia y la carga fúngica en riñón y pulmón.

Resultados. La AMB sola o en combinación con PSC demostró eficacia en el incremento de la supervivencia de los ratones infectados con cada una de las cepas estudiadas ($p < 0.05$). La combinación con PSC demostró eficacia en el incremento de la supervivencia de los ratones infectados con cada una de las cepas estudiadas ($p < 0.05$). La combinación no mejoró los resultados obtenidos con AMB ($p = 0.52$). PSC no incrementó la supervivencia de los animales en comparación al grupo control para ninguna de las cepas ensayadas ($P \geq 0.20$). En los estudios de carga fúngica AMB, PSC y su combinación redujeron significativamente las UFC/g en riñón y en pulmón ($p < 0.05$) en los animales infectados con ambas cepas respecto a los grupos control. Se encontraron diferencias significativas entre AMB y PSC ($p = 0.0079$) y, aunque la carga fúngica en los animales que recibieron la terapia combinada fue ligeramente inferior a los que recibieron las monoterapias, no se hallaron diferencias significativas respecto al tratamiento con AMB ($p = 0.82$), pero sí respecto al tratamiento con PSC ($p = 0.0079$).

Conclusiones. La combinación AMB-PSC ha mostrado una buena eficacia frente a la aspergilosis diseminada por *A. fumigatus*, sin demostrar beneficio sobre la monoterapia con AMB.

Diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis* (PcP) mediante PCR a tiempo real (rT-PCR) a partir de enjuagues orales

Cristina Esteban¹, Miriam Álvarez-Martínez¹, María Eugenia Valls¹, Carlos Agustí², Josefina Pardos¹, Miriam López¹, Jorge Puig de la Bellacasa¹ y José M. Miró²

¹Servicio de Microbiología, ²Servicio de Enfermedades Infecciosas y

³Servicio de Neumología, Hospital Clínic, Barcelona

*Correspondencia: Cristina Esteban Rdondo. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic. Barcelona. E-mail: cesteban@clinic.ub.cat

Antecedentes. La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* se diagnostica mediante la visualización microscópica de quistes en lavado broncoalveolar (LBA) en preparaciones teñidas con plata-metenamina. Estudios previos han demostrado la presencia de *P. jirovecii* en saliva de pacientes infectados.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es estudiar la utilidad de los enjuagues orales para el diagnóstico de PcP mediante PCR a tiempo real, como procedimiento menos invasivo para los pacientes.

Material y métodos. Se incluyeron en este estudio 44 pacientes con sospecha de PcP, atendidos en nuestro hospital entre mayo-2008 y febrero -2009, en los que la tinción de plata-metenamina del LBA había sido positiva. Se incluyeron también tres pacientes con sospecha de PcP y tinción negativa y 10 controles voluntarios sanos. Las muestras orales se obtuvieron mediante enjuague con 20 ml de suero salino fisiológico durante 30 segundos. Las muestras orales se centraron por centrifugación, se resuspendieron en tampón de lisis para hongos y se sometieron a fractura mecánica por agitación energética en un homogeneizador, en presencia de arena de vidrio. El ADN se extrajo con el sistema EZ1 de Qiagen. Se amplificó un segmento del gen DHPS siguiendo la metodología descrita por Álvarez-Martínez y col. (Diagnostic Mycrobiology and Infectious Disease 56 (2006) 153-60), con modificaciones.

Resultados. De los 47 pacientes, 44 tenían microscopía positiva y de éstos 30 fueron positivos por rT-PCR (68%) en los enjuagues orales. De los 3 pacientes con microscopía negativa, 2 fueron positivos en los enjuagues. Todos los controles sanos fueron negativos.

Conclusiones. La rT-PCR en enjuagues orales podría ser útil como método de cribado en pacientes de riesgo para PcP ya que en un alto porcentaje de casos son positivos en muestras obtenidas por enjuague oral. El enjuague es un procedimiento inocuo que permitiría no someter a una broncoscopia a un grupo de pacientes. Es necesario analizar un mayor número de casos control para asegurar que esta metodología no tiene falsos positivos. De la misma manera será necesario determinar cuánto tiempo tarda en negativizarse una muestra de enjuague en pacientes diagnosticados por visualización de quistes de *P. jirovecii* en tinción de plata metenamina de lavado broncoalveolar.

Eficacia experimental de la anidulafungina frente a cepas del complejo *Aspergillus terreus*

Marta Sanchis, Javier Capilla, Emilio Mayayo, Josep Guarro*

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

*Correspondencia: Prof. Josep Guarro. Unidad de Microbiología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, URV, Reus, España. Teléfono: + 34 977759359. Fax: +34 977759322. E-mail: josep.guarrojosep.guarro@urv.cat

Antecedentes. Las aspergilosis invasivas (AI) continúan siendo una importante causa de elevada mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. A pesar de ser *A. fumigatus* la especie predominante, el número de infecciones causadas por otras especies del género está aumentando notablemente en los últimos años. Entre éstas, *A. terreus* es de especial interés ya que parece tener mayor capacidad de disseminación que otras especies, es intrínsecamente resistente a la anfotericina B y se ha observado un aumento de cepas resistentes a los azoles, incluido al voriconazol que es el fármaco de elección para el tratamiento de la AI. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la anidulafungina (AFG) posee elevada actividad frente a *A. terreus* sin embargo no existen estudios sobre su eficacia *in vivo*.

Objetivos. Evaluar la eficacia *in vivo* de la AFG en el tratamiento de la infección diseminada por *A. terreus* en un modelo murino.

Métodos. Se evaluó la actividad *in vitro* de la AFG frente a dos cepas (FMR 8754 y FMR 8752) de *A. terreus* mediante la determinación de la CME, siguiendo la metodología descrita por el CLSI, y mediante la realización de curvas de mortalidad. Para los estudios *in vivo* se infectaron ratones OF-1 con 1×10^4 CFU/animal, por vía intravenosa, de cada una de las cepas de *A. terreus*. Los animales recibieron 5 o 10 mg/kg de AFG i.p. durante 7 días. La eficacia de los tratamientos se evaluó determinando la supervivencia de los animales, la reducción de la carga fúngica en bazo y riñón y las alteraciones histopatológicas en dichos órganos. Se determinaron las concentraciones séricas del fármaco 4 h después de finalizado el tratamiento.

Resultados. La AFG demostró ser fungistática y una buena actividad *in vitro* con valores de CME = 0,008 µg/ml para ambas cepas. AFG 10 mg/kg prolongó la supervivencia de los animales infectados con ambas cepas ($p \leq 0.0024$), sin embargo AFG 5 mg/kg sólo lo hizo en aquellos ratones infectados con la cepa FMR 8752 ($p = 0.0023$). No se observaron diferencias significativas respecto a la supervivencia entre ambas dosis.

En los estudios de carga fúngica ambas dosis de AFG redujeron las UFC/g de riñón y bazo ($p \leq 0.0024$) respecto al grupo control, siendo AFG 10 superior a AFG 5 en riñón ($p \leq 0.0070$) pero no en bazo ($p \leq 0.4995$). Los niveles séricos de AFG fueron dosis-dependientes y en ambos regímenes superiores a la MEC de ambas cepas.

El estudio histopatológico de los animales control mostró abundantes células fúngicas en parénquima renal con focos hemorrágicos, necrosis y angioinvasión. En los ratones tratados con AFG se observó una reducción dosis dependiente de células fúngicas y de focos necróticos sin embargo, no se observó angioinvasión ni signos de respuesta inflamatoria.

Conclusiones. La AFG mostró una buena eficacia *in vivo* frente a la aspergilosis sistémica por *A. terreus* sugiriendo su potencial uso como alternativa para el tratamiento de infecciones resistentes a los azoles y AMB.

Efficacy of novel antifungal compound series against clinically relevant yeasts and moulds

Javier Capilla¹, Josep Guarro^{1*}, Mike Birch², Jason Oliver², Mike Bromley³, Josefina Gené¹, Emilio Mayayo¹, Christine Batzler-Hatmann⁴, Mandy Döring⁴, Fredrik Lehmann⁵, Jonas Malmström⁵, Graham Sibley²

¹Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; ²F2G Ltd., Manchester, United Kingdom; ³University of Manchester, Manchester, United Kingdom; ⁴Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken, Germany;

⁵OnTarget Chemistry, Uppsala, Sweden.

*Correspondencia: Josep Guarro. Unitat de Micologia, Dep. Ciències Mèdiques Bàsiques, Fac. Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili. Reus, España. Teléfono: +34 977759359. Fax: +34 977759322. Email: josep.guarro@urv.cat

Background. Despite the advances over the last decades in the diagnosis and treatment of severe fungal diseases, the incidence and the fatal outcome of such infections remain still high. The emergence of species that are resistant or have innate resistance to the current antifungal compounds makes desirable the development of new antifungal agents. Recently, a new series of small molecule compounds, NF1, are under development by the NOFUN consortium. Such compounds show low molecular weight, good aqueous solubility and low plasma protein binding, making them suitable to be included, in the future, in the antifungal armamentarium.

Objectives. To evaluate the antifungal activity of NF1 series compounds against clinically relevant opportunistic fungi.

Methods. The MICs and kill-time curves of six NF1 compounds (NF001, NF002, NF003, NF004, NF005 and NF006) against *Aspergillus fumigatus* (n=3), *Fusarium solanii* (n=1), *Fusarium verticillioides* (n=1), *Scedosporium prolificans* (n=2), *Rhizopus oryzae* (n=1), *Candida albicans* (n=2), *Candida glabrata* (n=2), *Cryptococcus neoformans* (n=2) and *Cryptococcus gattii* (n=1) were determined. *Paecilomyces variotii* (strain ATCC3630) and *Candida parapsilosis* (strain ATCC 22019) were used as quality controls for filamentous and yeasts, respectively. Drugs were diluted on water and double-serially diluted within a range of 16 to 0.03 µg/mL following CLSI guidelines. Kill-time studies were performed at same concentration range and at 0, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h 100 µL of each tube was removed, diluted and placed onto PDA for CFU/mL determination.

Results. All compounds showed fungistatic effect against all the assayed fungi. In general, MIC₂ against yeasts were lower (≤ 0.06 µg/mL) than against moulds ($\text{MIC}_2 \leq 2$ µg/mL). Within the yeasts, NF1 series were slightly more active against *Candida* species than against *Cryptococcus* spp. (1 to 2 dilutions); however, NF004 and NF005 showed $\text{MIC}_2 \leq 0.03$ µg/mL against both genera. Although *S. prolificans* is considered a multiresistant species, NF1 series showed low MIC₂ values against this species (mean±SD: 0.27 ± 0.34 µg/mL) being the highest against *F. solani* (2.8 ± 1.5 µg/mL). Low MIC₂ values of NF1 series (≤ 0.5 µg/mL) were also obtained against the mucormycete *R. oryzae*. **Conclusions.** NF1 series showed the lowest MIC values against yeasts (*Cryptococcus* and *Candida*) but high activity against filamentous fungi such as *Aspergillus*, *Scedosporium* and *Rhizopus* has also been obtained. Although *in vivo* studies are required, these data suggest a promising antifungal efficacy of a new family of broad-spectrum antifungal compounds.

Comparación de la susceptibilidad a antifúngicos de cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e híbridas (AD) aisladas en España

Carlos Linares¹, Ferry Hagen², Jaques Meis², M^a Francisca Colom¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, UMH, Sant Joan D'Alacant, España; ²Departamento de Microbiología Medica y Enfermedades Infecciosas, CWZ, Nimega, Países Bajos

*Correspondencia: Carlos Linares. Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, UMH, Sant Joan D'Alacant, España. Teléfono: +34 965919364. Fax: +34 965919364. E-mail: carloslinares.gc@gmail.com

Antecedentes. *Cryptococcus neoformans* es un basidiomiceto levaduriforme encapsulado que produce meningoencefalitis en personas VIH positivas. *C. neoformans* presenta dos variedades: *C. n. var grubii* que corresponde con el serotipo A y *C. n. var neoformans* (serotipo D), las cuales por reproducción sexual pueden producir un híbrido *C. neoformans* serotipo AD. *C. neoformans* var. *neoformans* y la cepa híbrida son variedades que presentan una gran importancia en Europa, de donde son prácticamente exclusivas, ya que aproximadamente el 20% de los casos de Cryptococcosis en Europa son producidos por cepas híbridas. El estudio de la susceptibilidad a antifúngicos y su relación con el genotipo es esencial para una mejor comprensión de la especie, su capacidad de dispersión y la posibilidad de que surjan brotes de la enfermedad.

Objetivos. Este trabajo tiene dos objetivos: 1) Genotipar las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* e híbridos de diferentes regiones de la geografía española y 2) Estudiar las diferencias de la susceptibilidad a antifúngicos entre los híbridos y *C. neoformans* var. *neoformans*.

Métodos. Se estudió el genotipo (AFLP) y el mating type de 52 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* e híbridos aislados en España desde 1997. Estas mismas cepas se emplearon en el estudio de susceptibilidad a antifúngicos donde se midieron la concentración mínima inhibitoria (CMI) para Anfotericina B, Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol, Isoconazol y Posaconazol (Método CLSI).

Resultados. De las 52 cepas estudiadas aproximadamente el 70% son híbridos (AFLP3), perteneciendo 23 cepas a un grupo nuevo de AFLP3* no estudiado con anterioridad. Dos de las cepas estudiadas caracterizadas como híbridas en la colección CCA resultaron ser AFLP1A y AFLP1b (*C. neoformans* var. *grubii*). El estudio de susceptibilidad demostró que las cepas híbridas son más resistentes a los antifúngicos que las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans*, frente a Fluconazol, Posaconazol e Isoconazol. Por otra parte, a pesar de ser igual el valor de CMI más frecuente, las cepas híbridas tienden a mostrar una mayor resistencia frente a la administración de Anfotericina B, Itraconazol y Voriconazol. Dentro del grupo de cepas híbridas, el nuevo grupo de AFLP3* encontrado, presenta unos valores de CMI superiores para Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol e Isoconazol al compararlo con el resto de cepas AFLP3 estudiadas con anterioridad. Por último, al estudiar la susceptibilidad a antifungicos frente el tipo sexual (mating type), no se observan grandes diferencias, a excepción de la Anfotericina B (mayor resistencia en a) y el Fluconazol (mayor resistencia en a).

Conclusiones. A diferencia de otras regiones, en España el aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans* es menos frecuente que el de cepas híbridas AD, siendo estas más resistentes a los fármacos administrados para el tratamiento convencional de la criptococosis. El genotipado muestra un subgrupo del genotipo AFLP3 (AFLP3*) aislado por primera vez en España, que además presenta mayor resistencia a antifúngicos que los otros estudiados.

Actividad in vitro de los antifúngicos contra 100 aislamientos de sangre de *Candida* spp.

Cristina Marcos-Arias^{1*}, Elena Eraso¹, Janire Suárez-Anasagasti¹, Nerea Jauregizar², Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz³ 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 UPV/EHU, Bilbao. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao. ³ACIA Microbiología, Barcelona

*Correspondencia: Cristina Marcos. Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Apdo. 699, 48080 Bilbao. E-mail: cristina.marcos@ehu.es

Antecedentes. Entre las mejoras en el método de referencia del CLSI para el ensayo de la sensibilidad in vitro de *Candida* a los antifúngicos se han incluido la validación de la lectura de la CMI a las 24 h, la propuesta de nuevos puntos de corte específicos de especie para

fluconazol, voriconazol y equinocandinas y el uso de puntos de corte epidemiológicos de resistencia.

Objetivos. Evaluar la actividad antifúngica de los triazoles (fluconazol, posaconazol y voriconazol), equinocandinas (anidulafungina, caspo-

Table 1

Actividad antifúngica in vitro ($\mu\text{g/ml}$) contra aislamientos de sangre de *Candida* a las 24h.

		Especies (No. de aislamientos)					
		<i>Candida albicans</i> (40)	<i>Candida glabrata</i> (20)	<i>Candida parapsilosis</i> (20)	<i>Candida dubliniensis</i> (10)	<i>Candida krusei</i> (10)	All <i>Candida</i> (100)
Anfotericina B	Rango CMI	0,5-2	0,5-2	1	0,25-1	2	0,25-2
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	1/1	1/2	1/1	0,5/1	2/2	1/2
	MG CMI	0,871	1,072	1	0,467	2	0,953
Fluconazol	Rango CMI	0,12-2	1-8	0,25-1	0,12-0,5	16-64	0,12-64
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,25/0,5	4/8	0,5/0,5	0,25/0,5	16/32	0,5/8
	MG CMI	0,290	2,639	0,379	0,214	21,112	0,709
Posaconazol	Rango CMI	0,03-16	0,06-1	0,03-0,06	0,03-0,12	0,03-0,25	0,03-16
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,06/16	0,5/1	0,06/0,06	0,03/0,12	0,25/0,25	0,06/1
	MG CMI	0,117	0,518	0,047	0,044	0,142	0,113
Voriconazol	Rango CMI	0,03-0,12	0,03-0,12	0,03	0,03	0,12-0,5	0,03-0,5
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,03/0,03	0,03/0,12	0,03/0,06	0,03/0,03	0,25/0,25	0,03/0,12
	MG CMI	0,031	0,049	0,030	0,030	0,200	0,041
Anidulafungina	Rango CMI	0,03	0,03-0,06	1-4	0,03-0,06	0,03-0,12	0,03-4
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,03/0,03	0,06/0,06	2/4	0,03/0,03	0,06/0,06	0,03/2
	MG CMI	0,030	0,050	2,219	0,032	0,060	0,085
Caspofungina	Rango CMI	0,03-0,5	0,12-0,5	0,12-2	0,03-0,5	0,5-1	0,03-2
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,25/0,5	0,5/0,5	0,5/1	0,12/0,25	1/1	0,25/0,5
	MG CMI	0,191	0,307	0,539	0,098	0,534	0,263
Micafungina	Rango CMI	0,03-0,12	0,03-0,12	0,25-4	0,03-0,12	0,12-1	0,03-4
	$\text{CMI}_{50}/\text{CMI}_{90}$	0,03/0,06	0,12/0,12	1/1	0,03/0,12	0,5/1	0,06/1
	MG CMI	0,036	0,088	0,962	0,044	0,532	0,109

Table 2

Clasificación de los aislamientos de acuerdo con los nuevos puntos de corte específicos de especie y puntos de corte epidemiológicos descritos para cada antifúngico.

Especies (N)	PCE ($\mu\text{g/ml}$) (TS/No TS)	PCC ($\mu\text{g/ml}$)			
		S	SDD	I	R
<i>Candida albicans</i> (40)	Anfotericina B (40/0)				
	Fluconazol (37/3)	40	0		0
	Posaconazol (31/9)				
	Voriconazol (40/0)	40		0	0
	Anidulafungina (40/0)	40		0	0
	Caspofungina (20/20)	33		7	0
	Micafungina (34/6)	40		0	0
<i>Candida glabrata</i> (20)	Anfotericina B (20/0)				
	Fluconazol (20/0)	0	20		0
	Posaconazol (20/0)				
	Voriconazol (20/0)				
	Anidulafungina (20/0)	16		4	0
	Caspofungina (2/18)	2		8	10
	Micafungina (3/17)	6		14	0
<i>Candida parapsilosis</i> (20)	Anfotericina B (20/0)				
	Fluconazol (20/0)	20	0		0
	Posaconazol (20/0)				
	Voriconazol (20/0)	20		0	0
	Anidulafungina (20/0)	16		4	0
	Caspofungina (19/1)	20		0	0
	Micafungina (20/0)	19		1	0
<i>Candida dubliniensis</i> (10)	Anfotericina B (10/0)				
	Fluconazol (10/0)				
	Posaconazol (10/0)				
	Voriconazol (10/0)				
	Anidulafungina (10/0)				
	Caspofungina (8/2)				
	Micafungina (10/0)				
<i>Candida krusei</i> (10)	Anfotericina B (10/0)				
	Fluconazol (10/0)				
	Posaconazol (10/0)				
	Voriconazol (10/0)	10		0	0
	Anidulafungina (10/0)	10		0	0
	Caspofungina (1/9)	1		4	5
	Micafungina (2/8)	2		3	5

PCE: puntos de corte epidemiológicos; PCC: puntos de corte clínicos; TS: tipo salvaje; No TS: no tipo salvaje; S: sensible; SDD: sensible dependiente de la dosis; I: sensibilidad intermedia; R: resistente.

fungina y micafungina) y el polieno anfotericina B contra aislamientos de sangre de *Candida* según los nuevos puntos de corte clínicos y epidemiológicos del CLSI.

Métodos. Se ha ensayado la actividad in vitro de anfotericina B (Sigma), fluconazol (Sigma), caspofungina (MSD), posaconazol (MSD), anidulafungina (Pfizer), voriconazol (Pfizer) y micafungina (Astellas), contra 100 aislamientos de sangre de *Candida* mediante el método M27-A3 del CLSI. Los aislamientos fueron 40 *Candida albicans*, 20 *Candida glabrata*, 20 *Candida parapsilosis*, 10 *Candida dubliniensis* y 10 *Candida krusei*. La CMI se determinó la lectura a las 24h y la sensibilidad se clasificó de acuerdo a los nuevos puntos de corte clínicos del CLSI para *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*. Los puntos de corte epidemiológicos fueron determinados de acuerdo con Pfaller y Diekema (J Clin Microbiol 2012; 50: 2846-56). Se incluyeron las cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

Resultados. Anfotericina B, anidulafungina y voriconazol fueron los antifúngicos más activos (medias geométricas -MG- 0,953 µg/ml, 0,085 µg/ml y 0,041 µg/ml, respectivamente). Todos los aislamientos de *Candida glabrata* fueron sensibles dependientes de la dosis a fluconazol y los aislamientos de *Candida krusei* fueron resistentes. Las equinocandinas mostraron una actividad menor que la anfotericina B o voriconazol contra *Candida glabrata*. Diez aislamientos de esta especie fueron resistentes a caspofungina (MG 0,307 µg/ml), y cuatro y catorce aislamientos mostraron una sensibilidad intermedia a anidulafungina y micafungina (MG 0,050 µg/ml y 0,088 µg/ml, respectivamente). Además, 5 de los 10 aislamientos de *Candida krusei* mostraron resistencia a caspofungina y micafungina. De acuerdo con los puntos de corte epidemiológicos para caspofungina, 20 de 40 aislamientos de *Candida albicans* y la mayoría de los aislamientos de *Candida glabrata* y *Candida krusei* (18 y 9 aislamientos, respectivamente) fueron clasificados como aislamientos no salvajes. Cuando se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos, se observó una tendencia similar para micafungina contra *Candida glabrata* y *Candida krusei* (17 y 8 aislamientos no salvajes, respectivamente).

Conclusiones. La anfotericina B, anidulafungina y voriconazol mostraron una excelente actividad antifúngica contra las especies más frecuentemente aisladas de *Candida* en sangre.

Financiación. Este estudio ha sido financiado en parte por los proyectos PI11/00203 (FIS, Gobierno de España), GIC12 210-IT-696-13 y S-PR12UN002 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza).

Mucormicosis rinoorbitosinusal por *Rhizopus arrhizus*: un caso de medicina en equipo con un excelente resultado

A Imbernón Moya, JL Agud¹, JC Casqueiro², AM Stchigel⁴, A Ruiz-Burruecos³ R Domínguez, JL Trigueros⁵, E Bullido⁶, MS Cuétar³

¹Servicios de Dermatología, Medicina Interna, ²Otorrinolaringología y ³Microbiología del H.U. Severo Ochoa, Leganés (Madrid);

⁴Universitat Rovira i Virgili, Reus (Tarragona); ⁵Servicios de Medicina Hiperbárica y ⁶Medicina Interna, Hospital Gomez Ulla (Madrid)

Introducción. La mucormicosis es una patología poco frecuente, con una incidencia anual de 0'4-1'7 casos/millón de habitantes y una distribución mundial. Aparece principalmente en inmunodeprimidos, asociado sobre todo a neoplasias hematológicas y diabetes descontrolada. Hay varias formas clínicas, de las cuales la rinosinoorbitocefáral es la más frecuente de presentación, dando una clínica de sinusitis y celulitis orbitaria. La escara necrótica es la lesión más típica. **Caso clínico.** Varón 65 años que acude a urgencias por un debut diabético (descompensación hiperglucémica hiperosmolar sin cetosis) y clínica de sinusitis y celulitis periorbitaria. Valorado por servicio de urgencias, endocrino, otorrino e interna se sospecha mucormicosis y se interviene quirúrgicamente asociando tratamiento antifúngico con anfotericina B liposomal. Se confirma la presencia de *Rhizopus arrhizus* en todas las muestras quirúrgicas y se decide añadir caspofungina. Aunque inicialmente la respuesta fue satisfactoria, el paciente

vuelve a empeorar lo que requirió nuevo desbridamiento quirúrgico y su traslado al Hospital Gomez Ulla para tratamiento complementario con sesiones de cámara hiperbárica, continuando con tratamiento antifúngico y desbridamiento quirúrgico. El paciente evolucionó favorablemente con revisiones semanales por otorrino, infecciosas y endocrino. En la actualidad, está asintomático, con glucemias controladas, adecuado estado inmune y tratamiento con posaconazol de mantenimiento. (Se adjuntará presentación en video e iconografía de su evolución).

Discusión. Es una patología con evolución muy rápida, agresiva y de elevada morbilidad. Hay tres estrategias fundamentales en su manejo, las cuales se cumplieron en nuestro caso:

- 1) Diagnóstico precoz, donde es fundamental la sospecha clínica, dado que inicialmente los síntomas, signos e incluso pruebas de imagen son inespecíficas. El TAC facial y de senos es de elección, donde los hallazgos encontrados al principio pueden ser normales o indistinguibles de una sinusitis bacteriana. La biopsia con examen histológico y cultivo de sitios estériles es fundamental, aunque la rentabilidad del cultivo es del 50%, por lo que hay que recoger varias muestras.
- 2) Desbridamiento quirúrgico extenso, agresivo y temprano de las lesiones necróticas, acompañado de una terapia antifúngica efectiva de inducción con anfotericina B liposomal con/sin caspofungina durante un mínimo de 3-4 semanas. Una vez conseguida la respuesta clínica y radiológica, se procede a tratamiento de mantenimiento con posaconazol durante meses o años según clínica, cultivos y estado inmune.
- 3) Rápido control de las condiciones médicas subyacentes.

La cámara hiperbárica es un tratamiento complementario descrito en mucormicosis, pero no abalado por estudios prospectivos, que en nuestra experiencia ayudó de manera notable a la evolución del cuadro y le evitó al paciente secuelas estéticas.

Es de resaltar el trabajo y la excelente comunicación de un equipo multidisciplinar intra e interhospitalario. La medicina interdisciplinaria fue, es y debería ser una realidad, en especial en casos donde las decisiones tomadas para reducir la morbilidad del paciente llevan consigo un alto coste en momentos de crisis.

Tipificación de aislados de *C. parapsilosis* mediante el uso de microsatélites

Mar Martí-Carrizosa, Francesca March, Ferran Sánchez-Reus^{*}
Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Barcelona, España; Departamento de Genética y Microbiología.
Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España

^{*}Correspondencia: Ferran Sánchez-Reus. Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Teléfono: + 34 935537291. E-mail: fsanchezr@santpau.cat

Antecedentes. Durante las últimas tres décadas, se ha detectado un incremento de la incidencia de las candidemias, especialmente las causadas por especies no-*Candida albicans*. Entre ellas, a destacar *C. parapsilosis* que además de presentar una elevada prevalencia en pacientes pediátricos, presenta una baja sensibilidad intrínseca a las equinocandinas. El incremento en la prevalencia de *C. parapsilosis*, se podría atribuir al uso creciente de las equinocandinas como antifúngicos de primera línea para el tratamiento de las candidemias, no obstante es necesario descartar la presencia de brotes hospitalarios como causa de este aumento. *C. parapsilosis* es considerada una especie altamente clonal ya que presenta una baja variabilidad genética. Por esta razón, para su tipificación es necesario el uso de técnicas basadas en secuencias nucleotídicas que estudien regiones con una elevada variabilidad.

Objetivos. Los principales objetivos de este estudio son: 1. Detectar la presencia de cepas clonales de *C. parapsilosis* causantes de candidemia que presentan una posible relación espacio/tiempo en nuestro hospital y 2. Estudiar la clonalidad de aislados de *C. parapsilosis* que presentaron una mutación idéntica en el gen FKS1.

Métodos. Para la tipificación de *C. parapsilosis* se ha empleado la técnica de microsatélites o *Short Tandem Repeats* (STR), estudiándose un total de 4 locus (CP1, CP4, CP6 y B), mediante amplificación y análisis de los fragmentos de dichas regiones.

Resultados. De un total de 26 aislados de *C. parapsilosis* estudiados se identificaron 24 genotipos diferentes. Cinco aislados del estudio Fungemyca, 2 cepas control de nuestro hospital y la cepa ATCC 22019 presentaron, entre ellas, alelos distintos.

Objetivo 1: Los 14 aislados que podían presentar una relación espacio/tiempo, fueron identificados como diferentes ya que la mayoría de los alelos fueron distintos.

Objetivo 2: Dos aislados que presentaban la misma mutación fuera de la región HS2 del gen *FKS1* (M1328I) fueron identificadas como cepas no clonales.

De las seis cepas aisladas en distintos años (5 procedentes de nuestro Hospital y 1 del estudio Fungemyca) que presentaban la misma mutación fuera de la región HS1 del gen *FKS1* (S745L), tres mostraron exactamente los mismos alelos para los 4 locus y las otras 3 se consideraron microvariantes (2 de nuestro Hospital y 1 del estudio Fungemyca).

Conclusiones. La técnica de microsatélites se ha demostrado extremadamente útil para la tipificación de *C. parapsilosis*, habiéndose detectado una elevada variabilidad genética entre los aislados clínicos de *C. parapsilosis*, ya que de un total de 26 aislados estudiados, se han identificado 24 genotipos diferentes.

Se ha detectado una cepa endémica de *C. parapsilosis* que ha persistido en nuestro hospital como mínimo durante 5 años.

Detección molecular de *Aspergillus fumigatus* mediante PCR a tiempo real usando como diana el gen de la β -tubulina en una infección experimental

Jimena Victoria Fernandez-Molina^{1*}, Mónica Sueiro-Oliares¹,

Ana Abad-Díaz-de-Cerio², Andoni Ramírez-García³,

Fernando Luis Hernando¹, Javier Garaizar³, Aitor Rementeria¹

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la ¹Facultad de Ciencia y Tecnología, de la ²Facultad de Medicina y Odontología, Campus de Leioa, y de la ³Facultad de Farmacia, Campus de Vitoria/Gasteiz; de la UPV/EHU, España

*Correspondencia: Jimena Victoria Fernandez Molina. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la ¹Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU, Barrio Sarriena s/n 48940-Leioa. Teléfono: +34 946013411. Fax: +34 946013500. E-mail: jimenavictoria.fernandez@ehu.es

Antecedentes. Las aspergilosis son infecciones oportunistas producidas por hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus*. Dentro de ellas, la aspergilosis invasiva (AI) destaca por ser una importante causa de mortalidad en pacientes inmunodeprimidos. *Aspergillus fumigatus* es el agente etiológico más frecuente, seguido de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y otras especies con mucha menor incidencia. La falta de métodos diagnósticos adecuados hace que el tratamiento sea tardío y colabora en la elevada mortalidad de sus infecciones. Para la identificación a nivel de especie dentro del género *Aspergillus* se utiliza la amplificación seguida de secuenciación de diferentes genes entre los que destaca el gen de la β -tubulina (Belajee y col., 2007).

Objetivos. Desarrollar una PCR a tiempo real (q-PCR) para discriminar específicamente *A. fumigatus* y detectarlo durante una infección experimental en animales.

Métodos. En este estudio se utilizaron 44 cepas pertenecientes a 29 especies diferentes de *Aspergillus*, 18 especies de otros hongos filamentosos y levaduras, y 4 especies de bacterias. Además, se emplearon 6 muestras de ADN humano provenientes de voluntarios sanos. Se diseñó una pareja de cebadores y una sonda de hibridación específica Taqman para la detección de *A. fumigatus*. También se diseñó y optimizó un control interno con un fragmento de ADN del fago Lambda para detectar posibles inhibiciones de la PCR. Para la optimización

de la técnica y la determinación de los niveles de detección de la misma, se utilizó la cepa *A. fumigatus* Af-293.

Se desarrolló una infección experimental en hembras de ratón BALB/C inmunosuprimidas. Se extrajeron los órganos de animales infectados y controles, utilizando la mitad de ellos para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar Sabouraud con clorofenicol, y la otra mitad se conservó a -80°C, para la posterior extracción de ADN.

Resultados. La técnica permitió la detección específica de ADN de *A. fumigatus*, y no de otros hongos filamentosos, levaduras o bacterias testados. La combinación de tres ensayos independientes muestra un límite de detección de 50 fg de ADN genómico de *A. fumigatus*, con una eficiencia del 101.23± 0.929%. Además, se demostró que el método de extracción de ADN empleado no es capaz de obtener cantidades detectables por q-PCR de ADN de menos de 10³ y de 1 conidios, no germinados y germinados, respectivamente. Estos resultados mejoran considerablemente los obtenidos en un estudio previo (Abad-Díaz-de-Cerio y col., 2012), en el que se desarrolló una técnica de q-PCR para la detección de *A. fumigatus* usando como diana el gen *aspHS*, relacionado con la virulencia y monocicia.

Al aplicar la técnica a muestras de tejidos de ratones BALB/C infectados, se detectó ADN de *A. fumigatus* en aquellos que habían mostrado crecimiento positivo del hongo demostrado con UFC. No se detectó ADN de *A. fumigatus* en tejidos de ratones no infectados.

Conclusiones. La utilización de una diana multicopia como la del gen de la β -tubulina mejora la eficiencia y sensibilidad de la q-PCR para la detección específica de *A. fumigatus* durante la infección experimental.

Utilidad para el diagnóstico de la candidiasis invasora de la proteína metionina sintasa de *Candida albicans*

Aranzazu Sáez-Rosón^{1*}, Giulia Carrano¹, María Soledad Cuétara²,

Iñigo Olazabal³, Juan Carlos García-Ruiz³, María Dolores Moragues¹

¹Universidad del País Vasco UPV/EHU, Leioa-Bizkaia; ²Hospital Severo Ochoa, Leganés-Madrid; ³Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo-Bizkaia

*Correspondencia: Aranzazu Sáez Rosón. Grupo de estudio de la Infección Fúngica Invasora (GEIFI). Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco UPV/EHU. Teléfono: +34 946015686. E-mail: aranzazu.saez@ehu.es

Antecedentes. La detección de anticuerpos anti-micelio (CAGTA) mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha sido descrita como una buena herramienta diagnóstica de la candidiasis invasora (CI) presentando unos valores de sensibilidad del 78-89% y de especificidad del 91%-100% [1]. Mediante técnicas de inmunoproteómica, se ha establecido metionina sintasa (Met6) como uno de los antígenos reconocidos por los CAGTA [2,3], por lo que podría ser un biomarcador útil para el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas.

Objetivo. Determinar la utilidad de un ELISA basado en la detección de anticuerpos anti-Met6 para el diagnóstico de la CI.

Métodos y pacientes. La secuencia codificante de Met6 se amplificó a partir de ADN genómico de *Candida albicans* SC 5314 y se clonó en el vector pCR™2.1. Tras una digestión con las enzimas *Nde*I y *Not*I-HF™, se subclonó en el vector de expresión pET43.1b(+) y se transformaron las células de expresión *Escherichia coli* Rosetta™. La expresión de Met6 se indujo con IPTG 1mM y se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Una vez obtenida la proteína recombinante Met6, se desarrolló un ELISA para la detección de anticuerpos frente a ésta y se estudiaron prospectivamente 440 sueros de 241 pacientes (199 inmunocompetentes, 42 inmunodeprimidos) de diferentes servicios hospitalarios. Los pacientes se clasificaron en tres grupos. Grupo I: 101 pacientes (127 sueros) con factores de riesgo de CI pero sin evidencias clínicas ni microbiológicas de enfermedad fúngica invasora; grupo II: 34 pacientes (57 sueros) con evidencias de infección por otras especies

fúngicas diferentes de *Candida* (20 pacientes con *Aspergillus* spp. y 14 con *Pneumocystis* spp.); grupo III: 106 pacientes (256 sueros) con CI probada (54 *C. albicans* y 52 especies no-*albicans*). Además, se estudió la posible anticipación de la técnica con respecto al hemocultivo y a CAGTA en 10 pacientes con muestras anteriores al momento de diagnóstico por hemocultivo.

Resultados. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la ELISA anti-Met6, fueron 66%, 95%, 93,3% y 72,7% respectivamente. Considerando únicamente los pacientes infectados con *C. albicans*, la sensibilidad y el VPN mejoraron hasta valores de 74,1% y 87,3%, permaneciendo la especificidad y el VPP prácticamente inalterados. La detección de anti-Met6 se anticipó en el 40% de los pacientes estudiados con respecto al diagnóstico por hemocultivo y por IFI.

Conclusiones. La detección de anticuerpos anti-Met6 mediante ELISA mostró ser una buena herramienta diagnóstica en los pacientes con CI debida a *C. albicans*, destacando su alta especificidad y VPP, con índices superiores al 90%. La sensibilidad de esta técnica, se encuentra por debajo de los valores publicados para la detección de CAGTA, sin embargo es un método objetivo, reproducible y permite analizar en un mismo ensayo un número elevado de muestras.

Bibliografía

1. Moragues MD, et al. Enferm Infect Microbiol Clin. 2004; 22: 83-8.
2. Sáez-Rosón A, et al. Int Microbiol. 2013 (under review)
3. Sáez-Rosón A, et al. Mycoses. 2011; 54(Sup 2): 137

Aislamiento de *Mycotypha microspora* en un control rutinario de bioseguridad ambiental hospitalaria

Inmaculada Guerrero-Lozano, Lidia García-Agudo, Fátima Galán-Sánchez, Pedro García-Martos y Manuel Rodríguez-Iglesias*

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz
*Correspondencia: Manuel Rodríguez-Iglesias, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España. Teléfono: +34 956002045. Fax: +34 935003081. E-mail: manuel.rodriguez-iglesias@uca.es

Antecedentes. *Mycotypha microspora* es un miembro del orden Mucorales aislado principalmente del medio ambiente. *Mycotypha microspora* se aisló por primera vez en 1932 en la piel de *Citrus aurantium* (naranja amarga). Posteriormente se han reconocido otras dos especies: *M. africana*, aislada en 1963 del suelo en el sur de Zimbabwe y *M. indica*, aislada en 1985 también del suelo, en India. Es un hongo distribuido en todo el mundo, presente en el suelo, aire y plantas. Asimismo, se ha encontrado en roedores y algunos otros animales. En el ser humano solamente se ha descrito un aislamiento en el pus de una herida de un paciente, en Tailandia, y en las heces de un niño leucémico con diarrea, en Francia. En relación con su sensibilidad a los antifúngicos, al igual que otros zigomicetos, muestra altas concentraciones mínimas inhibitorias a los azoles, terbinafina e incluso a anfotericina B. Su papel patógeno sigue siendo, por ahora, desconocido.

Objetivos. Comunicar el aislamiento de *M. microspora* en un control de bioseguridad ambiental hospitalaria y describir las características de este hongo infrecuente en el medio hospitalario.

Métodos. El aislamiento que describimos, procedente de un control de bioseguridad ambiental de rutina en un Área de alto riesgo, se obtuvo del aire de una habitación del Área de Hospitalización del Servicio de Hematología y fue aislado siguiendo la metodología convencional de toma de muestras para hongos ambientales.

Resultados. El cultivo en agar de Sabouraud mostró un recuento de 20 ufc/m³ de *Mycotypha microspora* y 4 ufc/m³ de *Aspergillus niger*. Las colonias de *M. microspora* alcanzaron un tamaño mediano a los 5 días, eran de color gris parduzco, tenían una textura como de cés-

ped denso y se despegaban del medio con facilidad. La observación microscópica evidenció hifas cenocíticas, por lo general simples pero también ramificadas, con una vesícula en el ápice del esporangióforo. Las vesículas eran cilíndricas, con septos en el vértice y la base del carpóforo, en la madurez estaban cubiertas completamente de esporangiolas ovoides y globosas con pedicelos cortos y rectos, antes de la dehiscencia; al separarse los esporangiolas dejaban pequeños dentículos ligeramente elevados en la superficie de la vesícula. No se observaron zigosporas.

Conclusiones. *Mycotypha microspora* no ha sido descrita todavía en infecciones humanas, pero podría ser responsable de colonización en algunos pacientes. Debido a este hecho, los micólogos clínicos deberían estar familiarizados con este raro zygomyceto que podría presentar dificultades en su identificación. Sin embargo, su morfología colonial y microscópica, son muy características para facilitar la caracterización taxonómica.

Pneumocystis jirovecii en recién nacidos pretérmino: prevalencia y posibles implicaciones clínicas

Carmen de la Horra^{1,2*}, Ana González¹, Vicente Friaza^{1,2}, JM Varela^{1,2}, FJ Medrano^{1,2}, Antonio Pavón³, Nieves Respaldiza^{1,2}, Enrique Calderón^{1,2}

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/ CSIC/Universidad de Sevilla; ²CIBER de Epidemiología y Salud Pública. ³Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

*Correspondencia: Carmen de la Horra Padilla. ¹Instituto de Biomedicina de Sevilla, Av Mauro Montaner S/N Sevilla, España. Teléfono: +34 627314389. E-mail: cdlhorrabi@us.es

Introducción y objetivos. *Pneumocystis jirovecii*, conocido previamente como *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis*, es un hongo oportunista atípico, no cultivable, que infecta exclusivamente al ser humano y del que se desconocen aún muchos aspectos de su epidemiología y fisiopatología. La vía aérea se supone la forma de transmisión más importante en la especie humana, pero recientemente se ha podido comprobar su capacidad de transmisión transplacentaria. En modelos animales la infección por *Pneumocystis* produce disminución de las proteínas B y C del surfactante pulmonar, sustancia tensoactiva cuyo déficit constituye la base del síndrome de distrés respiratorio neonatal (SDRN). El objetivo de nuestro trabajo fue conocer la prevalencia de infección por *P. jirovecii* en neonatos prematuros y su posible relación con el SDRN.

Material y métodos. Se estudiaron muestras de aspirados nasales de 35 prematuros de menos de 36 semanas de gestación, obteniéndose previamente el consentimiento informado de los progenitores. Se identificó la presencia de colonización/infección por *P. jirovecii* mediante nested-PCR, PCR a tiempo real (PCR-RT) y genotipado mediante secuenciación directa del gen de la región mitocondrial mt-LSURNA. Se exigió la detección de ADN de *P. jirovecii* mediante nested-PCR por duplicado y por PCR-RT para considerar que un paciente estaba colonizado.

Resultados. Un 54% (19/35) de los prematuros estaban colonizados por *P. jirovecii*. Hubo una concordancia total en la presencia o no de colonización en los embarazos múltiples, con una pareja de gemelos, dos parejas de mellizos y tres trillizos colonizados por *P. jirovecii* y una pareja de gemelos y otra de mellizos no colonizados. De los 5 genotipos descritos para el gen mt-LSURNA se identificaron en los prematuros estudiados el genotipo 3 (52%) y el genotipo 1. Seis de los 35 prematuros presentaron un SDRN y de ellos, 4 (66%) tenían infección por *P. jirovecii* y los otros dos (34%) una infección bacteriana.

Conclusiones. Existe una alta tasa de colonización/infección por *P. jirovecii* en recién nacidos prematuros, siendo la vía transplacentaria la forma más probable de adquisición de la infección dada la concordancia hallada en los partos múltiples. La infección por *P. jirovecii*

podría ser una causa importante de síndrome de distrés respiratorio neonatal no considerada hasta ahora. Se requieren estudios más amplios para aclarar el papel de la infección por *P. jirovecii* en la patología neonatal.

Primer aislamiento clínico de *Candida galli*, una levadura del clado de *Yarrowia*, en un caso de tinea unguium

Fátima Galán-Sánchez, Inmaculada Guerrero-Lozano,

Lidia García-Agudo, Pedro García-Martos

y Manuel Rodríguez-Iglesias*

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

*Correspondencia: Manuel Rodríguez-Iglesias, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España. Teléfono: +34 956002045. Fax: +34 935003081. E-mail: manuel.rodriguez-iglesias@uca.es

Antecedentes. *Yarrowia* es un clado que incluye a la especie teleomorfa *Y. lipolytica* y una serie de especies de *Candida* (*C. lipolytica*, *C. galli*, *C. hispaniensis*, *C. incomunicans*, *C. bentonensis*, *C. phangngensis*, *C. osloensis*, *C. alimentaria*, *C. hollandica*, *C. yakushimensis* y *C. keelungensis*). *C. galli* está filogenéticamente relacionada con *C. lipolytica*. *C. galli* fue descrita por primera vez en 2004 en aves de corral en Hungría, en 2010 fue aislado de quelonios (*Podocnemis expansa* y *P. unifilis*) en Brasil, en 2011 se encontró en agua de mar en el Ártico y en aguas del Golfo Pérsico. No existen informes previos del aislamiento clínico de esta levadura.

Objetivos. En este estudio se describen las propiedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales de una cepa aislada de una muestra de la uña en un caso de tinea unguium.

Métodos. La cepa se aisló de una uña del pie en una mujer de 60 años. La muestra se procesa en agar de Sabouraud con cloranfenicol y agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida, incubándose a 28°C. Las características morfológicas y fisiológicas de la cepa se determinaron por asimilación de fuentes de carbono (ID32C, bioMérieux). Las colonias se identificaron por MALDI-TOF (Bruker Daltonics) e identificación molecular la región ITS (ITS1, ITS2 y 5.8rDNA). El perfil de susceptibilidad antifúngica se determinó mediante Sensititre YeastOne (Trek Diagnostics Systems). **Resultados.** La morfología de las colonias en medio Sabouraud y morfotipo en medio CHROMagar Candida fue similar a *C. lipolytica*, así como el perfil de la asimilación de fuentes de carbono. Las únicas diferencias fenotípicas con *C. lipolytica* eran la no asimilación de N-acetyl glucosamina, la ausencia de la ureasa y el crecimiento en 10% de NaCl con 5% de glucosa. MALDI-TOF no pudo conseguir una identificación fiable y la primera opción era *C. lipolytica* con un score de 1,584 ya que *C. galli* no está incluido en la base de datos de Bruker Biotype MS. La identificación del ADNr fue necesaria para identificar definitivamente *C. galli*, presentando una similitud de 99 % y 97 % entre el producto de secuenciación y *C. galli* cepa CBS 9722 (AY116080) y *C. galli* cepa CBS 9723 (AY346454), respectivamente. El fungograma mostró los siguientes resultados: anidulafungina 0,25 mg/L, micafungina 0,25 mg/L, caspofungina 1 mg/L, 5 -fluorocitosina ≥ 64 mg/L, posaconazol, 0,25 mg/L, voriconazol 0,25 mg/L, itraconazol 0,125 mg/L, fluconazol 16 mg/L, y anfotericina B 1 mg/L.

Conclusiones. *C. galli* nunca ha sido descrito en infección humana, por lo que su patogenicidad es desconocida. En nuestro caso no se pudo establecer su implicación en tinea unguium, pero la paciente mejoró después de recibir el tratamiento antimicótico con itraconazol. La ausencia de hallazgos de esta especie en las muestras clínicas puede ser debido a la imposibilidad para la identificación taxonómica sin recurrir a métodos genéticos. Todas las cepas identificadas como *C. lipolytica*, que no crecen a 35-37 °C, ureasa negativo y asimilación de

N-acetyl-glucosamina negativa, debe confirmarse genéticamente, ya que podrían corresponder a diferentes especies incluidas en el clado de *Yarrowia*.

Diseño de un nuevo microarray de genoma completo de *A. fumigatus*: análisis transcriptómico de la germinación

Mónica Sueiro-Olivares*, Jimena V. Fernández-Molina,

Ana Abad-Díaz-de-Cerio, Xabier Guruceaga, Eva Gorospe,

Elisabeth Pascual, Andoni Ramírez-García, Javier Garaizar,

Fernando Hernando,

Javier Margareto, Aitor Rementeria

Grupo de Microbiología Fúngica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España

*Correspondencia: Mónica Sueiro Olivares. Microbiología Fúngica. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa, España. Teléfono: +34 946013411. E-mail: monica.sueiro@ehu.es

Antecedentes. *Aspergillus fumigatus* es un hongo patógeno oportunista cuya principal vía de infección es la inhalación de sus conidios, considerándose como el patógeno fúngico de transmisión aérea más importante. Generalmente, el estudio de su mecanismo de patogenicidad se ha basado en la detección de una virulencia atenuada con cepas mutantes en las que se ha inactivado un gen relacionado con la virulencia. Sin embargo, debido a que la patogénesis de este hongo es multifactorial, la mejor manera de llevar a cabo estudios de virulencia es a través de análisis transcriptómicos y proteómicos. Para ello, uno de los mecanismos más eficaces es utilizar microarrays de expresión que permiten detectar la expresión de cada gen en cada momento.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es diseñar un microarray de genoma completo de *A. fumigatus* que permita llevar a cabo análisis del transcriptoma completo del hongo en diferentes condiciones ambientales y durante la infección.

Métodos. Utilizando las secuencias de RNAm de los 9.630 genes pertenecientes al hongo de la cepa *A. fumigatus* Af-293 disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el sistema eArray de Agilent technologies se diseñó un microarray de expresión de genoma completo. Para cada gen se diseñaron tres sondas específicas, y además, se añadieron 62 genes de calidad así como controles positivos y negativos incluidos por el propio sistema eArray. Se obtuvo finalmente un microarray compuesto por 45.220 sondas. Para comprobar su utilidad se llevaron a cabo hibridaciones de muestras de RNA extraídas del inicio de la germinación del hongo a 24°C. Los genes se clasificaron de acuerdo a su función biológica y a su importancia en la virulencia de este patógeno. Se validaron los resultados mediante RT-qPCR.

Resultados. De los 9.630 genes de *A. fumigatus*, 2.377 genes aparecen con una expresión dos veces por encima de la expresión basal. La clasificación de dichos genes ha mostrado que 670 están relacionados con el desarrollo, 467 con el metabolismo y 337 a proteínas de adhesión. Además, 21 enzimas extracelulares aparecen también sobre-expresadas. Cabe destacar que aparecen expresados genes relacionados con la virulencia como alérgenos, genes relacionados con la pared celular y un gen relacionado con la biosíntesis de gliotoxina. Sin embargo, otros genes expresados relacionados con el metabolismo del hierro actúan negativamente sobre la producción de sideróforos. Mediante RT-qPCR se demostró la sobre-expresión de los 10 genes seleccionados.

Conclusiones. El microarray diseñado ha demostrado ser una herramienta rápida, efectiva y de confianza para llevar a cabo estudios de expresión de *A. fumigatus*, que en un futuro puede permitir su utilización durante la infección para ampliar el conocimiento sobre la patogénesis de este hongo.