



## Ponencias



### **Candida auris: un ejemplo de infección intrahospitalaria en el siglo XXI**

Javier Pemán<sup>a,b</sup>, Alba Ruiz-Gaitán<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, España

<sup>b</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

Correspondencia: Javier Pemán. Correo electrónico: peman\_jav@gva.es

*Candida auris* es una levadura emergente multirresistente capaz de causar infecciones invasivas asociadas a una alta mortalidad. Desde la primera descripción en 2009, en la secreción ótica de un paciente japonés, se han comunicado casos de candidemia nosocomial en Corea del Sur (2011), India (2013), Pakistán (2013), Sudáfrica (2014), Kenia (2014), Kuwait (2014), Venezuela (2015), Reino Unido (2015), Colombia (2016), Israel (2016) y Estados Unidos (2016). Sin embargo, la incidencia real de las infecciones por *C. auris* podría ser subestimada debido a que esta especie es erróneamente identificada como *Candida famata*, *Candida haemulonii*, *Candida sake*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Rhodotorula glutinis* mediante técnicas de identificación comercial en los laboratorios clínicos (Vitek 2, API, AuxaColor y MALDI-TOF). Además, *C. auris* es habitualmente resistente al fluconazol y el voriconazol y, en algunos casos, también a las equinocandinas y la anfotericina B, lo que podría explicar los fracasos terapéuticos observados en infecciones diseminadas causadas por esta especie.

*C. auris* es un hongo capaz de sobrevivir y persistir en el ambiente hospitalario, y aunque no se conoce bien el mecanismo de transmisión todos los datos apuntan al contacto como el más probable a partir de pacientes colonizados/infectados o fómites, lo que causa brotes de infección nosocomial en unidades de críticos (hasta del 70% en algunos de los brotes publicados). La transmisión intra o interhospitalaria durante los brotes se ha podido confirmar mediante técnicas moleculares a partir de la contaminación del ambiente, de los dispositivos o de las manos del personal sanitario. Entre los brotes hospitalarios o nosocomiales que han afectado a un número importante de pacientes (>40) se encuentran el ocurrido en el Royal Brompton Hospital (Londres), que comenzó en 2015, y el del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia), que comenzó en abril de 2016, y que ha afectado, hasta la fecha, a más de 250 pacientes. En la presente comunicación se describen las características del primer brote producido en Europa continental por *C. auris*.

En nuestro hospital desde abril de 2016, hasta finales de febrero de 2017, se ha aislado *C. auris* en más de 250 pacientes, en 70 de ellos mediante hemocultivo. La mayoría de los pacientes con candidemia habían sido intervenidos quirúrgicamente y se encontraban hospitalizados en el servicio de reanimación. Los cultivos de vigilancia, realizados al inicio del brote, y de las manos de más de 100 trabajadores sanitarios fueron negativos, pero *C. auris* se aisló en el entorno de los pacientes colonizados/infectados. Las medidas implantadas inicialmente para el control de la transmisión fueron las siguientes: información al personal sanitario, precauciones de contacto y descolonización de los pacientes y uso de antifúngicos y clorhexidina para la manipulación de las vías centrales. A pesar de estas medidas se siguieron diagnosticando casos, por lo que las medidas se intensificaron: aislamiento de las cohortes de infectados/colonizados con personal sanitario exclusivo y vigilancia especial, intensificación de la limpieza en el entorno de los pacientes con clorhexidina, precauciones de contacto precoz y sesiones formativas semanales para los sanitarios.

A partir de la intensificación de las medidas la incidencia de casos está descendiendo lentamente.

### **Micobioma: experiencia en el estudio de muestras de LBA de pacientes no infecciosos**

María Francisca Colom

Laboratorio de Micología Médica. Grupo de investigación en Biomedicina Aplicada UMH-ISABIAL, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Campus de Sant Joan d'Alacant. Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

Correspondencia: María Francisca Colom. Correo electrónico: colom@umh.es

La utilización de las llamadas técnicas de secuenciación masiva, de segunda generación o *next generation sequencing*, ha permitido demostrar que las vías respiratorias bajas no son estériles y que, en condiciones de salud, albergan una colonización microbiana más o menos estable. Estos microorganismos constituyen la microbiota respiratoria. Esta microbiota está constituida mayoritariamente por bacterias, pero también por hongos, virus, protozoos y arqueas. Si nos referimos únicamente a los hongos hablaremos de micobiota, y cuando además de considerar los microorganismos tenemos en cuenta sus genes hablamos de microbioma o de micobioma respectivamente.

La descripción del micobioma se realiza con técnicas que permiten secuenciar simultáneamente muchos fragmentos de genoma de pequeño tamaño. Esta metodología está permitiendo descubrir la abundancia y diversidad de la microbiota asociada al ser humano y su relación con la fisiología y la patogenia de diversas enfermedades. El entorno más estudiado hasta el momento es el intestino humano, pero las vías respiratorias empiezan a ser también un ecosistema de gran interés, por su relación con el establecimiento y desarrollo de enfermedades pulmonares crónicas como la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las bronquiectasias y el asma. La composición y estructura del micobioma respiratorio varía entre individuos y poblaciones, de tal forma que es único para cada individuo y, aunque tiene una cierta estabilidad (core microbioma), evoluciona con el tiempo en todos los seres estudiados.

Hay escasos estudios sobre el micobioma de vías respiratorias, y además estos son plurales. En la mayoría se utiliza el espuma como muestra, pero en otros el enjuague orofaríngeo o el lavado bronquioalveolar. Además, la población varía entre pacientes con asma, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica u otras enfermedades, siendo muy escasos los realizados en población sana. A esta falta de homogeneidad hay que añadir la diversidad metodológica empleada en el laboratorio con las técnicas *next generation sequencing*.

Nuestro grupo ha llevado a cabo un estudio de micobioma respiratorio con un conjunto de pacientes atendidos en el Hospital General Universitario de Elda, que tenían indicación de broncoscopia por presentar clínica respiratoria *no sospechosa de infección*. Un total de 13 pacientes dieron el adecuado consentimiento para recoger muestras de lavado bronquioalveolar durante la broncoscopia. Además, ocho de ellos permitieron la toma de muestras en su entorno doméstico. Utilizamos el sistema solexa (*Illumina®*) de secuenciación masiva, realizando una amplificación de las secuencias identificativas (*Barcode*) de la región de los espaciadores ITS (ITS2). El análisis de secuencias se realizó con la aplicación *Qiime* y se compararon con la base de datos UNITE. La valoración de la riqueza en unidades taxonómicas operacionales y la variabilidad individual (alfa) e inter-individual (beta) encontrada nos confirma el carácter único y específico de los perfiles de micobioma de cada paciente. Las secuencias descritas corresponden mayoritariamente a hongos frecuentes en el medioambiente, que a su vez son frecuentes patógenos oportunistas, como *Cryptococcus*, *Candida* y *Aspergillus*. Estos resultados coinciden globalmente con otros estudios y confirman que la microbiota tiene una composición y evolución propia, única y específica del individuo y que está relacionada con el entorno.

## Difusión de la micología

Guillermo Quindós

GIC15 IT-990-16, UFI 11/25, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, España

Correspondencia: Guillermo Quindós. Tfno.: +34 946012854; fax: +34 946013495; correo electrónico: guillermo.quindos@ehu.eus, Twitter: @ErnestoQA

La difusión clásica de las disciplinas científicas se ha basado en los libros y revistas especializados. Estos medios siguen siendo válidos cauces de difusión y se observa un aumento continuo del número de libros, tanto impresos como en formatos digitales, y de los títulos de revistas dedicadas de forma exclusiva o compartida a la micología. Dentro de estas últimas la Web of Science recoge 20 títulos, entre los que se incluye la *Revista Iberoamericana de Micología*, de los que por lo menos 12 incluyen trabajos de micología médica. Sin embargo, estos cauces de difusión en muchas ocasiones plantean problemas de accesibilidad, tanto por su precio, como por su tirada limitada o la necesidad de una suscripción para su consulta.

Con el objetivo de mejorar la difusión de la micología clínica algunas publicaciones ofrecen un acceso electrónico a parte o a todo el contenido a través de páginas web o de bitácoras (blogs). Aquellas revistas que son órganos de difusión de sociedades científicas suelen estar enlazadas con páginas o portales electrónicos con un amplio contenido informativo. Un ejemplo es la página de nuestra asociación (<https://aemicol.com>).

Existen blogs independientes que incluyen información sobre micología médica dentro de un marco microbiológico más general, y un número cada vez mayor de páginas en Facebook y cuentas en Twitter que tienen como temática importante nuestra área de trabajo. Algunas de estas iniciativas independientes o asociativas son *ISHAM* (<https://www.isham.org/about-isham/mycological-heroes>), *The Aspergillus website* (<http://www.aspergillus.org.uk/>), *ASM Blog* (<https://www.asm.org/index.php/blogs>), *Mycology on line* (<https://mycology.adelaide.edu.au/>), *LIFE* (<http://life-worldwide.org/>), *GAFFI* (<https://www.gaffi.org/>), *MicroBioblog* (Ignacio López Goñi, <http://microbioun.blogspot.com.es/> y <https://twitter.com/microbioblog?lang=es>), *Curiosidades de la Microbiología* (Manuel Sánchez, <http://curiosidadesdelamicro-biologia.blogspot.com.es/>), o dos de mis bitácoras, *Mikrosphera* (SciLogs de Investigación y Ciencia, <http://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/74/posts>) y *Mikrobios* (Ehusfera de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU, <http://www.ehu.eus/ehusfera/mikrobios/>).

La difusión de la micología clínica en radio y televisión está menos desarrollada. Mencionaría mi pequeña contribución personal con el espacio *Mundo Micro* dentro del programa de Radio Euskadi *La Mecánica del Caracol*, conducido por Eva Cabillo Domínguez (<http://www.eitb.eus/es/radio/radio-euskadi/programas/la-mecanica-del-caracol/>) y los podcasts de la ASM (<https://www.asm.org/index.php/podcasts>).

En esta charla, además de repasar algunas de estas iniciativas, deseo hablaros de una experiencia de divulgación científica exitosa en el campo de la microbiología, realizada a través de Twitter y Facebook, dentro de los llamados cursos *online* masivos y abiertos o «MOOC» (*Massive Online Open Courses*).

## Comunicaciones



### Susceptibilidad a azoles de las secciones *Flavi*, *Terrei* y *Nigri* de *Aspergillus*

Alba Pérez-Cantero, Loida López Fernández, Josep Guarro Artigas, Javier Capilla Luque

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

Correspondencia: Javier Capilla. Tfno.: +34 977759381; fax: +34 977759322; correo electrónico: javier.capilla@urv.cat

**Antecedentes.** *Aspergillus* spp. es un patógeno oportunista que puede dar lugar a infecciones invasoras en pacientes inmunocomprometidos, con una mortalidad que oscila entre el 42-64% y que se incrementa hasta el 90% en el caso de cepas resistentes a los tratamientos de elección. La especie causal más frecuente es *Aspergillus fumigatus*, pero actualmente la incidencia de especies pertenecientes a las secciones *Flavi*, *Nigri* y *Terrei* ha aumentado. El tratamiento de primera línea es el voriconazol (VRC), pese a que el número de cepas resistentes a azoles se ha incrementado en los últimos años. En *A. fumigatus* se ha correlacionado este hecho con la sobreexpresión de los genes diana *cyp51*, pero los mecanismos de resistencia en otras especies permanecen poco estudiados.

**Objetivos.** Estudiar los perfiles de sensibilidad *in vitro* a VRC, posaconazol (PSC) e itraconazol (ITC) de *Aspergillus* (secciones *Flavi*, *Nigri* y *Terrei*) según *Epidemiological Cut-off values* (ECV) establecidos para cada sección y antifúngico. Analizar la expresión de los genes *cyp51A* y *cyp51B* en la sección *Nigri* para relacionar posibles patrones de expresión con mecanismos de resistencia a los azoles.

**Métodos.** Partiendo de 210 cepas de las secciones *Flavi*, *Terrei* y *Nigri* se realizó un screening inicial en placas de PDA suplementadas con VRC, PSC o ITC a concentraciones iguales y dobles del ECV establecido para cada sección y antifúngico. Posteriormente se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas tolerantes a ambas concentraciones, siguiendo el documento M38-A2 del CLSI. Se estudió la expresión de los genes *cyp51A* y *cyp51B* de cepas de la sección *Nigri* en presencia (4 µg/ml) y ausencia de VRC mediante qRT-PCR, normalizando su expresión con el gen constitutivo *act1*.

**Resultados.** Respecto a la sensibilidad *in vitro*, y en función de los ECV establecidos, el ITC presentó actividad frente al 94,7% de cepas de la sección *Flavi*, el 100% de la sección *Terrei* y el 96,4% de la sección *Nigri*. En cuanto al PSC mostró efectividad en el 100% de cepas de las tres secciones. El VRC fue efectivo en el 98,7% de las cepas de la sección *Flavi*, el 96,2% de la sección *Terrei* y el 90% de la sección *Nigri*. Las CMI modales del ITC se mantuvieron en 1 µg/ml para las tres secciones, mientras que para el PSC fueron 0,25 µg/ml para la sección *Flavi*, 0,03 µg/ml para la sección *Terrei* y 0,12 µg/ml para la sección *Nigri*. En referencia al VRC los valores fueron 1 µg/ml para las secciones *Flavi* y *Nigri* y 0,5 µg/ml para la sección *Terrei*. Los estudios de expresión génica en la sección *Nigri* sugirieron mayor expresión del gen *cyp51A* en las cepas estudiadas. Mientras este se sobreexpresó en presencia de VRC, la expresión del *cyp51B* pareció mantenerse constitutiva.

**Conclusiones.** El PSC presenta la mejor actividad *in vitro* frente a las tres secciones, seguido por el ITC en las secciones *Terrei* y *Nigri* y el VRC en la sección *Flavi*. En la sección *Nigri* parece observarse una expresión constitutiva del gen *cyp51B*, y una expresión mayor del gen *cyp51A* que aumenta en presencia de VRC. No obstante, no parece haber una correlación con los valores de CMI.

### Hongos xerotolerantes y xerofílicos en mieles de España y Argentina: nuevos taxones para la ciencia

Ernesto Rodríguez Andrade, Alberto M. Stchigel Glikman, José F. Cano Lira

*Unidad de Micología y Microbiología Ambiental, Facultad de Medicina e IISPV, Rovira i Virgili, Reus, España*

Correspondencia: Ernesto Rodríguez Andrade. Tfno.: +34 977759341; correo electrónico: dc.ernesto.roan@outlook.com

**Antecedentes.** Los hongos son organismos capaces de crecer en una gran diversidad de ambientes, incluso en condiciones medioambientales extremas, tales como sustratos con una actividad de agua ( $A_w$ ) muy baja. Los hongos adaptados a crecer de forma óptima a  $A_w \leq 0,85$  se denominan xerofílicos, y los que crecen subóptimamente en dichas condiciones xerotolerantes. La miel es un producto natural elaborado por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores y de otras secreciones de las plantas, cuya  $A_w$  es  $\leq 0,60$  y está compuesta mayoritariamente por monosacáridos (dextrosa y fructosa).

**Objetivos.** El objetivo del trabajo fue aislar e identificar hongos viables en muestras de mieles de diversas regiones de España y de Argentina, y esclarecer la relación filogenética de dichos taxones con los evolutivamente más próximos.

**Métodos.** Se procesaron 83 muestras de España y una de Argentina. Dentro de las placas Petri se homogenizaron 1 ml de una dilución 1:10 de miel en agua y 15 ml de medio G18 estéril y fundido a 55 °C, se dejaron gelificar y se incubaron hasta 4 semanas a 25 °C. El material de las colonias fúngicas se montó en ácido láctico para caracterizar sus estructuras vegetativas y reproductivas, y realizar una identificación presuntiva. Las colonias seleccionadas en función de su potencial taxonómico fueron aisladas en una nueva placa de Petri con G18, y se les realizó extracción y purificación de ADN para amplificar mediante PCR los marcadores moleculares ITS y D1-D2. Para determinados taxones se amplificaron también los marcadores RPB2, Tef y CaM. Los amplicones obtenidos se secuenciaron en Macrogen Europa Inc. (Madrid, España). Las secuencias fueron comparadas en línea con las depositadas en el GenBank mediante BLAST. Para su análisis filogenético se procedió al alineamiento de las secuencias mediante ClustalW. La reconstrucción filogenética se realizó con el CIPRES.

**Resultados.** Se aislaron 216 cepas, 104 de las cuales fueron secuenciadas y sometidas a un análisis filogenético. Las especies identificadas fueron las siguientes: *Alternaria multiformis*, *Ascospaera atra*, *Aspergillus asperescens*, *Aspergillus montevidensis*, *Aspergillus pseudoglaucus*, *Bettsia alvei*, *Candida magnoliae*, *Candida sorbosvorans*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Eremascus albus*, *Monascus*

*pilosus*, *Monascus purpureus*, *Monascus ruber*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium biforme*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium cravenianum*, *Penicillium obscurum*, *Pharenochaete chrysosporium*, *Rhizopus oryzae*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Skoua fertilis*, *Zygosaccharomyces siamensis*, *Zygosaccharomyces gambellarensis* y *Zygosaccharomyces melli*. Las nuevas especies encontradas para la ciencia fueron las siguientes: *Oidiodendron mellicola*, *Skoua asexualis*, *Spiroarthrosporum mellicola*, *Sphaeroarthrosporum catenulatum*, *Talaromyces basipetosporus*, *Talaromyces collarinsignis* y *Talaromyces erastimelis*.

**Conclusiones.** Se ha puesto en evidencia la presencia de una gran diversidad fúngica en las muestras de miel estudiadas. Algunos de estos hongos, tales como *Ascospaera atra* y *Bettsia alvei*, son conocidos patógenos de abejas, y al igual que *Candida magnoliae*, *C. sorbosivorans*, *Eremascus albus*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Skoua fertilis*, *Zygosaccharomyces siamensis*, *Z. gambellarensis* y *Z. mellis* son considerados organismos xerofílicos. Las especies de *Aspergillus*, *Monascus* y *Penicillium* identificadas se consideran organismos xerotolerantes. Varias de las cepas fúngicas son novedades taxonómicas para la ciencia, entre las cuales hay dos géneros nuevos, y un total de siete nuevas especies distribuidas en los órdenes Eurotiales, Helotiales y Onygenales.

### Tres casos de infección cutánea por especies de *Alternaria* de la sección *Infectoriae*

Isabel Iturrieta-González<sup>a</sup>, Isabel Pujo<sup>b</sup>, Dania García<sup>a</sup>, Vanesa Morente<sup>c</sup>, Rosana Queralt<sup>c</sup>, Simona Iftimie<sup>d</sup>, Frederic Ballester, Josepa Gené<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unitat de Micologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut i Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

<sup>b</sup>Laboratori de Referència Sud, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Tarragona, España

<sup>c</sup>Servei de Patologia, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Tarragona, España

<sup>d</sup>Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Tarragona, España

Correspondencia: Isabel Iturrieta-González. Tfno.: +34 689172671; correo electrónico: isabeliturrieta@gmail.com

**Antecedentes.** *Alternaria* es un género de hongos ubicuos, con especies mayoritariamente saprófitas, pero también patógenas de plantas y animales. En el ser humano se han descrito como agentes responsables de alergias, así como de infecciones cutáneas y subcutáneas principalmente en pacientes inmunodeficientes. Las especies más relevantes en clínica son *Alternaria alternata* y *Alternaria infectoria*, pertenecientes respectivamente a las secciones *Alternaria* e *Infectoriae* de este género.

**Objetivos.** Realizar un estudio polifásico para la identificación de los aislamientos de *Alternaria* obtenidos de especímenes clínicos de tres casos de infección cutánea en pacientes inmunodeficientes.

**Métodos.** La infección fúngica se confirmó en los tres casos mediante un examen histopatológico de la biopsia cutánea y/o cultivos repetidos. Los cultivos primarios de las cepas se obtuvieron en agar Sabouraud con cloranfenicol; la caracterización macro y microscópica de los aislamientos se realizó en agar patata dextrosa, agar harina de avena y agar patata-zanahoria, con incubación a 25°C en la oscuridad durante 14 días. La identificación molecular se realizó utilizando tres marcadores: *RPB2*, *GAPDH* y *TEF1*. El alineamiento de secuencias se realizó con el programa Mega v. 6.0., a través del algoritmo ClustalW (refinado por MUSCLE en caso necesario). Para los análisis filogenéticos se aplicó el modelo Tamura Nei con distribución Gamma.

**Resultados.** Los aislamientos se obtuvieron de pacientes con importantes enfermedades de base (trasplante pulmonar, cáncer de próstata y cuadro de procesos patológicos múltiples), a partir de biopsias cutáneas (FMR 16235 y FMR 16556) y exudados (FMR 16868) de las lesiones. El examen morfológico preliminar nos permitió identificar los aislamientos como pertenecientes a la sección *Infectoriae*, hecho que fue confirmado a nivel molecular con la comparación de secuencias del gen *RPB2* en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST. El análisis filogenético, individual y combinado de *RPB2*, *GAPDH* y *TEF1* mostró que los tres aislamientos eran genéticamente diferentes a *A. infectoria*, la especie con mayor incidencia en clínica. La reconstrucción filogenética basada en *GAPDH* mostró que FMR 16235 estaba relacionada con *Alternaria incompleta*, si bien morfológicamente presentaba conidios de mayor tamaño (30-60 µm vs. 30-40 µm en *A. incompleta*). En cambio, los aislamientos FMR 16556 y FMR 16868 resultaron filogenéticamente más cercanos a *Alternaria caespitosa*, tanto para la filogenia basada en *RPB2* como en *GAPDH*. Sin embargo, dichas cepas se caracterizaron por presentar dictioconidios en cadenas ramificadas y por la ausencia del típico crecimiento meristemático descrito para *A. caespitosa*.

**Conclusiones.** El análisis multigénico y las diferencias morfológicas observadas en los aislamientos estudiados nos permiten concluir que se trata de potenciales nuevas especies de la sección *Infectoriae* y, por tanto, de tres nuevos patógenos oportunistas para el hombre.

### Evaluación de la actividad antifúngica de anfotericina B liposomal y voriconazol en un modelo murino de fusariosis

Patricia Navarro-Rodríguez<sup>a</sup>, Marcela Guevara Suárez<sup>a,b</sup>, Katihuksa Paredes<sup>a</sup>, Adriana Celis<sup>b</sup>, Josep Guarro<sup>a</sup>, Javier Capilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unitat de Microbiología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

<sup>b</sup>Laboratorio de Micología y Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia

Correspondencia: Javier Capilla. Tfno.: +34 977759381; fax: +34 977759322; correo electrónico: javier.capilla@urv.cat

**Antecedentes.** La fusariosis diseminada es una infección emergente causada por *Fusarium* spp. con una elevada mortalidad en pacientes inmunodeficientes. Las especies más comúnmente aisladas en clínica pertenecen a los complejos *Fusarium solani* (FSSC) y *Fusarium oxysporum* (FOSC). En general, *Fusarium* muestra resistencia a los azoles y a las equinocandinas, mientras que la sensibilidad al voriconazol (VRC) y a la anfotericina B (AMB), ambos recomendados en la fusariosis invasiva, es variable. Recientemente se han definido valores de corte epidemiológicos (VCE) para los principales complejos de especies de *Fusarium*, siendo los VCE de AMB 8 µg/ml para FOSC y FSSC y los de VRC de 16 µg/ml y 32 µg/ml para FOSC y FSSC, respectivamente.

**Objetivos.** Evaluar la eficacia de la anfotericina B liposomal (AMBL) y VRC en un modelo murino de fusariosis diseminada por cepas clínicas de FOSC y FSSC, y determinar si los VCE establecidos pueden ser clínicamente relevantes.

**Métodos.** Se evaluó la actividad *in vivo* de VRC y AMBL frente a cuatro cepas de *Fusarium*, dos identificadas como *F. keratoplasticum* (FSSC) y dos pertenecientes al clado 3 de FOSC. Las cepas de *F. keratoplasticum* presentaron CMI de AMB de 2 y 4 µg/ml y de 8 y > 16 µg/ml para VRC, mientras que las de FOSC fueron 2 y 4 µg/ml para AMB y > 16 µg/ml para VRC. Estas CMI equivalen a cepas *wild type* y *non-wild type* para los VCE establecidos. Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones macho (OF-1), que fueron inmunosuprimidos con ciclofosfamida a 200 mg/kg administrada dos días antes de la infección y después cada cinco días. Los

animales fueron infectados por vía intravenosa con un inóculo de  $5 \times 10^3$  o  $2 \times 10^7$  UFC de FSSC y FOSC, respectivamente. Los tratamientos se iniciaron 24 h tras la infección y se administraron diariamente durante 10 días y consistieron en AMBL administrada i.v. a 10 mg/kg o VRC oral a 40 mg/kg. La eficacia se evaluó mediante el estudio de la supervivencia y la determinación de la carga fúngica en riñones, hígado y pulmones nueve días después de la infección.

**Resultados.** Independientemente de la cepa utilizada, ni AMBL ni VRC incrementaron significativamente la supervivencia. El tratamiento con VRC no redujo la carga fúngica en ningún órgano estudiado y AMBL tan solo lo hizo en el riñón ( $p = 0,013$  vs. control) de los animales infectados con una cepa de *F. keratoplasticum*.

**Conclusiones.** El modelo murino evaluado mostró poca eficacia de LAMB y VRC *in vivo* para las cepas de *F. keratoplasticum* y FOSC. Nuestros resultados sugieren que los ECV propuestos para estos dos antifúngicos no tienen un valor clínico para predecir la respuesta al tratamiento.

#### **Disseminated cryptococcosis due to *Cryptococcus deuterogattii* (aflp6/vgiii) in an immunocompetent patient from a non-endemic area**

Francisco R. Ortúño<sup>a</sup>, Lucía Puente<sup>a</sup>, Elena Rodríguez<sup>a</sup>, Juan José Jusdado<sup>a</sup>, Ferry Hagen<sup>b</sup>, María Soledad Cuétara<sup>a</sup>, María Francisca Colom<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands

<sup>c</sup>University Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Spain

Correspondencia: Francisco Ortúño. E-mail: fran0787@hotmail.es

**Background.** Cryptococcosis is a worldwide occurring invasive mycoses associated with significant morbidity and mortality. After the outbreak in Vancouver Island (British Columbia Canada), the occurrence of cases due to *C. deuterogattii* outside the endemic areas is of importance. In Europe, infections with this species are uncommon and mostly related to travels to endemic areas.

**Case report.** Here we report a case of meningoencephalitis and pneumonia in a previously healthy 67 year-old man admitted to our hospital in Madrid (Spain) with a 3-week history of progressive and severe headaches, asthenia and general malaise. The headache was localized in the frontotemporal area, radiating to occipital area, and increasing with an effort and decubito position; it caused nausea and occasional vomiting. The patient had no previous medical history but had a travel history to Azores Islands the month before. On admission, his temperature was 37 °C, with no respiratory symptoms and without signs of meningeal irritation. The examination of the skin, heart and abdomen was normal. A pulmonary computer tomography (CT) scan revealed multiple nodular lesions in the lungs. CT scan of the CNS was normal. Nevertheless, a cranial magnetic resonance imaging (MRI) showed multiple hypodensities and hyperdensities in bilateral basal ganglia and other abnormalities (vasculitic lesions). The initial exam of the cerebrospinal fluid (CSF) showed leukocytes 112 cells/mm<sup>3</sup>, protein 80 mg/dl, glucose 48 mg/dl (blood glucose 117 mg/dl) and a positive India ink stain with significant cryptococcal antigen titers (1/2048). The CSF opening pressure was 25.5 cm water. Antigenemia was also positive (1/4096). The identification of the fungus obtained from the CSF and the bronchoalveolar lavage accomplished by conventional methods was *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Subculture of the isolate on CGB agar showed a member of the *Cryptococcus gattii* species complex. Further molecular biology methods (URA5-RFLP and AFLP) showed that the species involved was *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII). Antifungal susceptibility studies using the clinical laboratory standards institute

(CLSI) microdilution broth methodology revealed no antifungal drug resistance. Induction therapy with liposomal amphotericin B (200 mg/d) (5 weeks and 2 days) and flucytosine 1500 mg/6 h (4 weeks and 3 days) was used. Due to toxicity or intolerance, the last antifungal was replaced by oral fluconazole (800 mg/d). Besides, due to the severe intrathecal inflammation, the patient had to receive oral prednisone. After 2 months, the fluconazole and prednisone therapy is continued and the patient has improved both neurologically and clinically. However, the pulmonary image has not changed. From the microbiological point of view antigen titers (CSF and serum) are still high (1/256 and 1/1024, respectively), and although the CSF culture turned negative a positive India ink stain remains.

**Conclusions.** The present case again remarks the importance of performing a complete identification of cryptococcal species in the routine clinical laboratory routine. This is especially interesting in patients with a history of travels to endemic areas that would be of risk. In our country, no autochthonous cases or environmental isolations of this species had ever been reported so far. Then, Azores Islands was the place suspected to be the origin of the infection. Nevertheless, there are no reports from this part of the world about the existence of the very virulent *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) species.

#### **Modelos *in vitro* para el estudio de la infección del hongo patógeno *Aspergillus fumigatus***

Xabier Guruceaga<sup>a</sup>, Guillermo Ezpeleta<sup>b,c</sup>, Fernando L. Hernando<sup>a</sup>, Andoni Ramírez-García<sup>a</sup>, Aitor Rementería<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fungal and Bacterial Biomics Research Group. Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología

<sup>b</sup>Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

<sup>c</sup>Servicio de Medicina Preventiva e Higiene Hospitalaria, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Navarra, España

Correspondencia: Xabier Guruceaga. Tfno.: +34 946015964; correo electrónico: xabier.guruceaga@ehu.eus/aitor.rementeria@ehu.eus

**Antecedentes.** *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprofita capaz de producir un amplio rango de enfermedades dependiendo del estado inmunológico del paciente. En los últimos años los estudios de expresión fúngica de genoma completo, mediante diferentes tecnologías, han permitido contextualizar los datos de expresión génica, permitiendo así avanzar en los mecanismos de virulencia del hongo y en la selección de dianas de interés terapéutico y diagnóstico, además de avanzar en el conocimiento de la biología del hongo desde un punto de vista global.

**Objetivos.** Estudiar el comportamiento de *A. fumigatus* durante el contacto *in vitro* con macrófagos y células epiteliales pulmonares y compararlo con infecciones animales.

**Métodos.** Se desarrollaron dos modelos *in vitro* de infección independientes que consistieron en la coincubación de los conidios del hongo *A. fumigatus* (cepa Af293) con una línea celular de epitelio pulmonar humano (A549) y la línea celular de macrófagos murinos (RAW264.7) mediante una carga infectiva de 5 conidios por célula epitelial y de 10 conidios por macrófago. Los cultivos celulares fueron crecidos en medio RPMI 1640 (10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina y 2 mM penicilina-estreptomicina) que se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda en presencia del 5% de CO<sub>2</sub>. La infección de estos cultivos se prolongó hasta que el hongo alcanzó un 30% de germinación, momento en el cual se lisaron las células y se recuperó el hongo, del que se extrajo su ARN total. Se utilizó como control cultivos del hongo sin presencia celular. El ARN fúngico se utilizó para una hibridación con el microarray de genoma completo Agilent Whole *A. fumigatus Genome*

*Expression 44K v.1* (AWAFUGE v.1). Tras el análisis de los resultados se valoraron todos aquellos genes cuya expresión fue estadísticamente significativa con respecto a la situación control ( $p < 0,05$ ), prestando especial atención a aquellos genes que mostraron un cambio de expresión de al menos 2,8 veces superior al del control ( $\log_2 FC > 1,5$ ).

**Resultados.** De los 9.630 genes de *A. fumigatus* representados en el microarray el 55,3% y el 22,2% de los genes del hongo mostraron expresión diferencial en contacto con la línea de células de epitelio pulmonar A549 y la línea celular de macrófagos RAW 264,7, respectivamente. De entre los genes que mostraron una sobreexpresión diferencial superior a 1,5 de  $\log_2 FC$  cabe destacar, entre otros, la presencia de genes relacionados con el metabolismo de la tirosina y, por consecuencia, con la producción de piomelanina, fosfatases ácidas relacionadas con el metabolismo de la tiamina y genes relacionados con la producción de fumagilina. Estudios previos realizados por nuestro grupo detectaron la expresión diferencial de algunos de estos genes durante las infecciones animales.

**Conclusiones.** Durante el contacto *in vitro* de *A. fumigatus* con los principales tipos celulares presentes en el ambiente pulmonar se activan rutas que se han visto como importantes en infecciones animales previas, lo cual hace que estos modelos de infección sean interesantes para el estudio de la virulencia del hongo.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue subvencionado por la UPV/EHU (GIU15/36 y PPG17/41). Xabier Guruceaga ha sido financiado por el Gobierno del País Vasco.

#### Impacto de los polimorfismos del gen *ERG11* y su nivel de expresión en la resistencia de *Candida tropicalis* a voriconazol

Patricia Navarro Rodríguez, Loida López Fernández, Josep Guarro Artigas, Javier Capilla Luque

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

Correspondencia: Javier Capilla. Tfno.: +34 977759381; fax: +34 977759322; correo electrónico: javier.capilla@urv.cat

**Antecedentes.** *Candida tropicalis* es un hongo oportunitista emergente que puede dar lugar a infecciones sistémicas en individuos inmunocomprometidos y producir una elevada mortalidad. El tratamiento de primera línea de la candidiasis invasiva incluye las equinocandinas y las formulaciones lipídicas de anfotericina B, aunque los triazoles son la mejor alternativa en los pacientes neutropénicos. En la actualidad el notable aumento de aislamientos de *Candida* resistentes a los azoles es un grave problema de índole clínica. Estudios recientes apuntan a una relación entre la resistencia a los azoles y la sobreexpresión o las mutaciones del gen *ERG11* (diana de los azoles) en especies de *Candida*, así como la sobreexpresión de transportadores activos de membrana, aunque su contribución no está del todo dilucidada dado el carácter multifactorial del fenómeno de resistencia a los antifúngicos. En este estudio se pretende dilucidar el papel de *ERG11* en la resistencia de *C. tropicalis* a los azoles.

**Objetivos.** Determinar la presencia de mutaciones puntuales y el grado de expresión de *ERG11* en aislamientos clínicos de *C. tropicalis* con diferente sensibilidad *in vivo* e *in vitro* al voriconazol (VRC).

**Métodos.** Se evaluó la actividad *in vitro* de VRC frente a 18 cepas de *C. tropicalis* de acuerdo al documento M27-A3 del CLSI. Para los ensayos de eficacia *in vivo* se utilizaron 14 cepas seleccionadas en función de la CMI determinada *in vitro*. Se infectaron i.v. grupos de 10 ratones machos OF-1 con  $1 \times 10^5$  células/animal, y se trataron con VRC (40 mg/kg p.o. QD) durante 10 días. Para los estudios moleculares se incluyeron las 18 cepas del estudio. Para detectar mutaciones en *ERG11* se amplificaron y secuenciaron las regiones promotora y codificante del gen mediante cebadores específicos. El análisis de expresión relativa de *ERG11* se realizó mediante qRT-PCR a partir de cultivos crecidos durante 18 h en condiciones control (sin antifúngico) e inducción (10 µg/µl VRC), utilizando el gen de referencia *RDN5.8*.

**Resultados.** Los valores CMI de las cepas estudiadas fueron desde 0,06 a 16 µg/ml, siendo la media 2 µg/ml. VRC mostró eficacia *in vivo* frente a cepas con CMI  $\leq 0,25$  µg/ml; sin embargo no fue efectivo cuando la CMI fue mayor a 1 µg/ml, lo que se correlaciona con los puntos de corte clínico (PCC) establecidos. Se identificaron mutaciones puntuales en *ERG11* en 3 de las 12 cepas resistentes a VRC. Dos de las mutaciones causaron el cambio de un aminoácido (D445 V, D448 V), y la tercera la aparición de un codón de terminación prematuro y la delección de 134 aminoácidos en la proteína codificada. Se observó la inducción de *ERG11* en presencia de VRC en 16 de las 18 cepas estudiadas, aunque con niveles de expresión variables que oscilaron entre  $10^{-4}$  y 10 respecto al gen de referencia.

**Conclusiones.** La presencia de VRC en condiciones *in vitro* incrementó la expresión de *ERG11* en el 89% de los aislamientos de *C. tropicalis*; sin embargo, los valores de expresión elevados no se relacionaron con un incremento en los valores de CMI. En las cepas más resistentes (CMI = 16) se detectaron mutaciones en *ERG11* que podrían ser responsables de su menor susceptibilidad.

#### Desarrollo de un modelo farmacocinético/farmacodinámico semi-mecánístico para anidulafungina contra *Candida albicans* y *Candida glabrata* con datos de tiempo-letalidad *in vitro*

Unai Caballero<sup>a</sup>, Sandra Gil-Alonso<sup>a</sup>, Elena Eraso<sup>b</sup>, Guillermo Quindós<sup>b</sup> y Nerea Jauregizar<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

<sup>b</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

Correspondencia: Unai Caballero. Tfno.: +34 946015675; correo electrónico: unai.caballero@gmail.com

**Antecedentes.** Dentro del limitado arsenal terapéutico disponible para tratar las candidemias, las equinocandinas se han convertido en agentes de primera elección por su gran eficacia y excelente perfil de seguridad. Sin embargo, la resistencia a estos fármacos parece ir en aumento. La modelización farmacocinética/farmacodinámica basada en curvas de tiempo-letalidad *in vitro* ayuda a obtener información de la actividad farmacológica de los fármacos antifúngicos y proponer medidas para luchar contra la aparición de resistencias antimicrobianas.

**Objetivos.** Estudiar la actividad *in vitro* de la anidulafungina contra *Candida albicans* y *Candida glabrata* mediante curvas de tiempo-letalidad y desarrollar un modelo farmacocinético/farmacodinámico que describa dicha actividad.

**Métodos.** Se analizó la actividad de la anidulafungina contra *C. albicans* NCPF 3153 y *C. glabrata* ATCC 90030 mediante curvas de tiempo-letalidad con métodos estáticos y dinámicos. Se estudiaron concentraciones en un rango de 0,0015-2 mg/l para los experimentos estáticos y una única concentración de 5,47 mg/l, coincidente con la concentración máxima alcanzada en clínica, para los ensayos en sistema dinámico. Se obtuvieron muestras a las 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h que se sembraron por triplicado en agar glucosado de Sabouraud, con incubación a 37°C durante 48 h para determinar las unidades formadoras de colonias. Los datos obtenidos fueron modelados mediante el programa NONMEM v7.3.0.

**Resultados.** La anidulafungina, cuya actividad antifúngica fue descrita mediante un efecto  $E_{max}$  sigmoidal, mostró un efecto fungicida contra *C. glabrata*, mientras que en *C. albicans* no se observó reducción en el número de UFC/ml. De los modelos estudiados aquel que contemplaba la existencia de dos subpoblaciones en cada especie, una sensible al fármaco y otra menos sensible, fue el que mejor describió los datos obtenidos. En la tabla 1 se muestran las estimaciones obtenidas para los parámetros de dicho modelo.

**Tabla 1.** Estimaciones de los parámetros farmacodinámicos y variable residual

	<i>C. albicans</i> NCPF 3153		<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	
	Estático	Dinámico	Estático	Dinámico
Kg (h-1)	0,436	0,371	0,29	0,345
Kd (h-1)	0,011	0,025	0,22	0,043
Hill	0,435	0,226	1,64	90,5
E <sub>máx</sub> (h-1)	0,114	0,114	0,273	0,167
EC50 (mg/l)	0,013	1,12	0,894	0,049
N <sub>máx</sub> (UFC/ml)	8,00 (fijado)	8,00 (fijado)	8,00 (fijado)	8,00 (fijado)
RV	0,26	0,23	0,77	0,51

EC<sub>50</sub>: concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo; E<sub>máx</sub>: efecto máximo del fármaco; Hill: coeficiente de Hill; K<sub>g</sub>: constante de crecimiento; K<sub>d</sub>: constante de muerte celular; N<sub>máx</sub>: número máximo de células en el sistema; RV: variable residual.

**Conclusiones.** El modelo desarrollado, que contempla la existencia de subpoblaciones con diferente sensibilidad a la anidulafungina, se ajustó correctamente a los datos experimentales obtenidos. El desarrollo de modelos puede ayudar al diseño de regímenes de dosificación que minimicen la aparición de resistencias.

**Financiación.** Este estudio ha sido financiado por los proyectos GIC15/78 IT-990-16 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza) y UFI 11/25 (UPV/EHU).

#### Galleria mellonella como modelo para el estudio de la candidiasis invasiva producida por especies del complejo *Candida glabrata*

Ainara Hernando, Estibaliz Mateo, Elena Eraso, Guillermo Quindós  
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, España

Correspondencia: Ainara Hernando. Tfno.: +34 946015675; correo electrónico: ainara.hernando@ehu.eus

**Antecedentes.** *Candida glabrata* es la segunda o tercera causa de candidiasis invasora y ha adquirido gran importancia clínica debido a su reducida sensibilidad a algunos fármacos antifúngicos. Las especies *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis* son especies filogenéticamente muy cercanas a *Candida glabrata*.

**Objetivos.** Estudiar la virulencia de las especies *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* en el modelo invertebrado *Galleria mellonella* de candidiasis invasiva.

**Métodos.** Se realizaron ensayos de supervivencia y producción de hemocitos utilizando larvas de *G. mellonella*. La infección se llevó a cabo con dos cepas de referencia de cada especie: *C. glabrata* ATCC 90030 y NCPF 3203, *C. nivariensis* CBS 9984 y CECT 11998 y *C. bracarensis* NCYC 3397 y NCYC 3133. Se inyectaron inóculos de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células/ml de cada cepa de *Candida* a grupos de 20 larvas y se incubaron a 37 °C. Se comprobó la supervivencia de las larvas cada 24 h, hasta un total de 120 h. Se realizó un análisis estadístico con cada cepa mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y la estimación de las diferencias entre ellas mediante la prueba log-rank ( $p \leq 0,05$ ). La producción de hemocitos en *G. mellonella* se estudió tras infectar cinco larvas con los tres inóculos de levadura e incubar durante tres horas a 37 °C. Se extrajo la hemolinfa y se hicieron recuentos de los hemocitos mediante hemocitómetro. En todos los ensayos se utilizaron dos controles, uno de larvas sin inocular y otro de larvas inoculadas con PBS suplementado con ampicilina (20 µg/ml).

**Resultados.** La supervivencia de los invertebrados a las 120 h y la producción de hemocitos se muestran en la tabla 1.

En todos los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre las larvas control y las infectadas ( $p \leq 0,05$ ). La supervivencia de las larvas varió en función del inóculo injectado siendo, en todos los casos, menor cuanto mayor era la concentración de levadura. La producción de hemocitos en las larvas infectadas también varió en función del inóculo; se reconocieron menor número de hemocitos con los inóculos más altos.

**Tabla 1**

Cepa	Inóculo (células/ml)	Supervivencia (%)	Hemocitos/ml hemolinfa
Control sanos		87,3	$8,66 \times 10^6$
Control PBS + ampicilina (20 µg/ml)		77,4	$1,77 \times 10^7$
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	$1 \times 10^5$	58,3	$2,58 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	37,5	$2,23 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	12,5	$1,31 \times 10^7$
<i>Candida glabrata</i> NCPF 3203	$1 \times 10^5$	61,7	$2,47 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	35,0	$2,15 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	11,7	$1,21 \times 10^7$
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	$1 \times 10^5$	58,3	$2,08 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	47,5	$1,38 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	21,3	$1,68 \times 10^7$
<i>Candida nivariensis</i> CECT 11998	$1 \times 10^5$	72,5	$2,39 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	55,0	$1,50 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	28,3	$1,17 \times 10^7$
<i>Candida bracarensis</i> NCYC 3397	$1 \times 10^5$	57,5	$2,26 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	53,8	$2,06 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	33,3	$2,15 \times 10^7$
<i>Candida bracarensis</i> NCYC 3133	$1 \times 10^5$	75,0	$2,14 \times 10^7$
	$1 \times 10^6$	62,5	$2,03 \times 10^7$
	$1 \times 10^7$	35,0	$2,05 \times 10^7$

**Conclusiones.** *G. mellonella* es un modelo de infección sencillo y útil para estudiar las candidiasis invasoras causadas por *C. glabrata* y las especies estrechamente relacionadas *C. bracarensis* y *C. nivariensis*. Se requieren altas dosis de estas especies para generar infección en las larvas, y una vez establecida la infección permiten seguir eficazmente su desarrollo y la respuesta defensiva de la larva.

**Financiación.** Este estudio ha sido financiado por los proyectos GIC15/78 IT-990-16 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza) y UFI 11/25 (UPV/EHU).

#### Utilidad de la genotipificación mediante microsatélites para el estudio de las relaciones filogenéticas entre aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*

Camino Trobajo-Sanmartín<sup>a</sup>, Guillermo Ezpeleta<sup>b,c</sup>, Irene Jurado<sup>a</sup>, Emilia Cantón<sup>d</sup>, Javier Pemán<sup>d</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup> y Guillermo Quindós<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

<sup>b</sup>Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia

<sup>c</sup>Servicio de Medicina Preventiva e Higiene Hospitalaria, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Navarra, España

<sup>d</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

Correspondencia: Camino Trobajo-Sanmartín. Tfno.: +34 946015675; correo electrónico: camino.trobajo@ehu.eus

**Antecedentes.** La gran mayoría de las infecciones causadas por el complejo *Candida parapsilosis* se relacionan con la asistencia sanitaria. Estos hongos presentan una serie de características fenotípicas y genotípicas que les permiten sobrevivir en el medio hospitalario y se han asociado con la aparición de brotes infecciosos nosocomiales. Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud constituyen una importante causa de morbimortalidad entre los pacientes, por este motivo es fundamental desarrollar técnicas preventivas y de vigilancia con el fin de reducir al máximo el número de infecciones. La tipificación molecular de regiones microsatélites (STR) es una herramienta de genotipificación que posibilita el estudio de las relaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos de microorganismos, de aplicación en la investigación de brotes infecciosos.

**Objetivos.** Avanzar en la utilidad y aplicabilidad de la genotipificación mediante STR en el estudio de relaciones filogenéticas entre aislamientos clínicos de *C. parapsilosis sensu stricto*.

**Métodos.** Se emplearon 297 aislamientos de *C. parapsilosis sensu stricto* pertenecientes a pacientes que participaron en el estudio multicéntrico FUNGEMYCA realizado en España, entre enero de 2009 y febrero de 2010. La genotipificación se realizó mediante un nuevo protocolo múltiple con un esquema de amplificación touchdown para la detección de cuatro regiones STR (CP1, CP4, CP6 y B5). Tras la genotipificación e identificación de los genotipos presentes en las diferentes comunidades autónomas (CC. AA.) participantes en el estudio se procedió al estudio de las relaciones filogenéticas.

**Resultados.** El análisis de los fragmentos STR obtenidos permitió diferenciar 156 genotipos, de los cuales 115 (73,72%) fueron observados una sola vez y 41 (26,28%) estaban representados por dos o más aislamientos. De estos 41 genotipos, nueve (5,77%) genotipos fueron «específicos» de la comunidad autónoma y 32 (20,51%) genotipos considerados genotipos «nacionales», en los que el mismo perfil genotípico era común en aislamientos procedentes de al menos dos CCAA. Tanto Andalucía como Madrid fueron las CCAA que presentaron un mayor número de genotipos diferentes, y únicamente cinco CCAA mostraron genotipos «específicos» de la comunidad autónoma a la que pertenecían. La distribución de los genotipos más prevalentes no fue homogénea en todo el país, observándose genotipos propios del norte, sur y centro de España. **Conclusiones.** La genotipificación mediante STR permite realizar estudios filogenéticos de detección de genotipos locales y epidémicos en distintas áreas geográficas o instituciones sanitarias. Además, este método de genotipificación, junto con los datos clínicos y epidemiológicos, podría ser una herramienta útil para la identificación de posibles orígenes y mecanismos de transmisión en las infecciones por *C. parapsilosis sensu stricto*.

**Financiación.** Este estudio ha sido financiado por los proyectos GIC15/78 IT-990-16 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza) y UFI 11/25 (UPV/EHU). Camino Trobajo-Sanmartín ha sido financiada por la Fundación Jesús Gangoiti Barrera.

### Isolation of *Scedosporium/Lomentospora* in cystic fibrosis patients

Elisa Ibáñez-Martínez<sup>a</sup>, Amparo Pastor<sup>b</sup>, Patricia Falomir-Salcedo<sup>c</sup>, Adolfo Magraner-Martínez<sup>c</sup>, Javier Pemán-García<sup>c</sup>, Amparo Solé-Jover<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Biomarcadores y Medicina de Precisión, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Unidad de Fibrosis Quística y Trasplante Pulmonar, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain<sup>c</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

**Table 1.** Clinical features, outcome and treatment of patients suffering scedosporiasis

Patient	Underlying disease	Age/Sex	Species	Sample (n)	Treatment	Type of IFI/Site	30 days related mortality	1 year evolution	Time from Tr (days)/Previous colonization
1	LTR/CF	26/M	<i>S. apiospermum</i>	BAL (1), sputum (1)	Amphotericin B (INH), posaconazole (O)	Probable/Lung	No	Favourable	29/no
2	LTR/CF	36/F	<i>S. apiospermum</i>	Bronchial suture (1), BAL (3), BAS (5), sputum (3)	Amphotericin B (INH), posaconazole (IV), terbinafine (O)	Probable/Lung	No	Favourable	15 /yes
3	LTR/CF	34/M	<i>L. prolificans</i>	BAL (1)	Amphotericin B (IV, INH), voriconazole (O)	Possible/Lung	No	Not related dead	5668/no
4	LTR/CF	21/F	<i>L. prolificans</i>	BAL (5), BAS (2), sputum (2)	Amphotericin B (IV), Voriconazole (IV)	Probable/Lung	No	Favourable	12/no
5	CF	27/M	<i>S. apiospermum</i>	Sputum (2)	Amphotericin B (INH), posaconazole (O)	Probable/Lung	No	Unknown	-

Correspondence: Elisa Ibáñez. Tfno.: +34 961246673. E-mail: elisa.im86@gmail.com

**Background.** *Scedosporium/Lomentospora* are ubiquitous fungi nowadays considered emergent pathogens. Although they can cause a broad range of infections, they are frequently found colonizing the respiratory tree in chronic pulmonary diseases.

**Aims.** To describe *Scedosporium/Lomentospora* isolates in cystic fibrosis (CF) patients at La Fe hospital and to assess their clinical significance.

**Materials and methods.** Microbiological and clinical data from patients suffering CF and infected with *Scedosporium* isolates were gathered from January 2011 to December 2015. Samples were inoculated in Saboureaud chloramphenicol agar and incubated at 30 °C for 15-30 days. The fungal identification of the isolates was based on macroscopic and microscopic features. Modified EORTC/MSG definitions (2008) were used to classify IFI episodes. Colonization and single isolation were considered in asymptomatic patients.

**Results.** During the study period 264 *Scedosporium/Lomentospora* isolates were obtained from samples of 36 CF patients. *S. apiospermum* complex grew in 219 (82.95%) samples, *L. prolificans* was isolated in 40 samples (15.15%), and 5 samples (1.89%) yielded both *S. apiospermum* complex and *L. prolificans*. The medium age was 22 years old (range 8-45, SD 9.05), with no differences in sex distribution: 17 (47.22%) patients were females and 19 (52.78%) were males. *Scedosporium/Lomentospora* were only found in respiratory samples (264 sputum, 9 bronchoalveolar lavage, 8 bronchoaspirates, 4 faringeal exudates and 1 bronchial suture). From these 36 patients, 6 were lung transplant recipients (LTR) and one had a liver transplant. There were 4 probable IFI, 3 of them in LTR, and one possible IFI. The clinical features, outcome and treatment of the patients suffering IFI are listed on the table. Nine patients had only a single isolation of *Scedosporium/Lomentospora*, while 22 were considered true colonized patients, with 10 patients having persistent colonization with more than five isolations of *Scedosporium/Lomentospora*. Estimated prevalence of *Scedosporium/Lomentospora* colonization in CF in our hospital is 13.83% (*S. apiospermum* complex 10.1%, *L. prolificans* 3.72%, mixed colonizations 1.06%).

### Conclusions

- *Scedosporium/Lomentospora* colonizes a significant number of CF patients. Its clinical significance is yet to be cleared.
- *Scedosporium/Lomentospora* isolation in CF LTR is usually significant: 66.67% of CF LTR patients with growth of *Scedosporium/Lomentospora* suffered IFI.

- Transplantation in patients colonized with *Scedosporium/Lomentospora* is very controversial. Only one out of our IFI patients was colonized before transplantation. However, the patient developed a very early infection.
- Combined treatment with amphotericin B and an azole was always the choice.
- There was no mortality associated to *Scedosporium/Lomentospora* IFI in CF, differing from the high mortality reported in the literature.

### Actividad *in vitro* de la combinación de fluconazol y ciclosporina A contra *Candida*

Juan Daniel Cartón<sup>a</sup>, Nerea Jauregizar<sup>b</sup>, Elena Eraso<sup>a</sup> y Guillermo Quindós<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, España

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Enfermería, UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, España

Correspondencia: Juan Daniel Cartón. Tfno.: +34 946015675. Fax: +34 94 601 3495

**Antecedentes.** Los inhibidores de la calcineurina presentan actividad sinérgica con los azoles contra aislamientos de *Candida*. Destaca la ciclosporina A (CsA), un inmunosupresor que inhibe la actividad de la calcineurina, encargada de regular la fisiología del hongo e implicada en la resistencia a los fármacos antifúngicos.

**Objetivos.** Evaluar la interacción *in vitro* entre el fluconazol (FLC) y CsA contra aislamientos clínicos y cepas de referencia de *Candida* mediante la combinación de concentraciones en tablero de ajedrez y por curvas de letalidad.

**Métodos.** Se estudiaron un total de 30 cepas que incluyeron 8 *Candida albicans*, 7 *Candida glabrata*, 5 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida krusei*, 2 *Candida nivariensis*, 2 *Candida orthopsilosis* y 2 *Candida tropicalis*. *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 se utilizaron como controles de calidad en este estudio. La actividad antifúngica del fármaco se determinó mediante un método de microdilución basado en los protocolos propuestos por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 y European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) EDef 7.2. Las interacciones entre ambos fármacos se calcularon con el índice de concentración inhibidora fraccionada (FICI) mediante la técnica de tablero de ajedrez. Además, se evaluaron las curvas de letalidad (*time-kill*) mediante el método propuesto por Cantón et al. (2004).

**Resultados.** La combinación de la CsA con FLC redujo notablemente las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de FLC. Por el método EUCAST, la CMI de FLC disminuyó de >64->128 µg/ml a 1-4 µg/ml para 5 aislamientos de *Candida albicans*, mientras que por el método CLSI la reducción para esas mismas cepas fue de >64 µg/ml a 1 µg/ml. La CMI para *Candida glabrata* frente a FLC también disminuyó por ambos métodos. La combinación de FLC y CsA ejerció un efecto sinérgico en la mitad de las cepas estudiadas, 11 de las cuales eran aislamientos de *Candida* resistentes a FLC. Mediante el análisis de las curvas de letalidad también se observó un efecto sinérgico. Esta combinación incluso resultó ser fungicida para *Candida albicans* NCPF 3153 (descenso > 3 Log UFC/ml respecto al inóculo inicial), tal y como se observa en la figura.

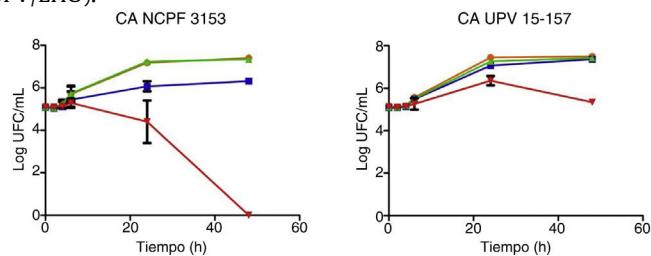
**Conclusiones.** La combinación de CsA con FLC incrementó el efecto del antifúngico frente a algunos aislamientos de *Candida* resistentes a FLC. Los dos modelos utilizados para la cuantificación de la eficacia de la combinación, tablero de ajedrez y curvas de letalidad, mostraron resultados concordantes.

**Tabla 1.** Actividad antifúngica *in vitro* de la ciclosporina A (CsA) con el fluconazol (FLC) frente a cepas de *Candida*.

Cepas	EUCAST-valores CMI (µg/ml)					CLSI-Valores CMI (µg/ml)						
	Solo		En combinación		FICI	INT	Solo		En combinación		FICI	INT
	FLC	CsA	FLC	CsA			FLC	CsA	FLC	CsA		
CA ATCC 64124	> 128	> 128	128	4	0,52	IND	> 64	> 128	64	2	0,51	IND
CA NCPF 3153	1	> 128	0,25	16	0,31	SIN	1	> 128	0,25	64	0,50	SIN
CA UPV 06-100	1	> 128	1	0,25	1,00	IND	1	> 128	1	0,25	1,00	IND
CA UPV 10-170	> 64	> 128	1	0,25	0,01	SIN	> 64	> 128	1	2	0,02	SIN
CA UPV 15-147	> 128	> 128	4	1	0,01	SIN	> 64	> 128	1	1	0,01	SIN
CA UPV 15-154	> 128	> 128	2	2	0,02	SIN	> 64	> 128	1	2	0,02	SIN
CA UPV 15-157	> 128	> 128	2	1	0,13	SIN	> 64	> 128	1	2	0,02	SIN
CA UPV 15-176	> 128	> 128	2	> 128	1,01	IND	> 64	> 128	1	> 128	1,01	IND
CG ATCC 90030	32	> 128	8	4	0,07	SIN	16	> 128	2	64	0,38	SIN
CG UPV 07-185	32	> 128	2	2	0,13	SIN	32	> 128	4	4	0,14	SIN
CG UPV 07-200	32	> 128	1	4	0,05	SIN	16	> 128	2	2	0,13	SIN
CG UPV 11-452	64	> 128	16	16	0,13	SIN	32	> 128	8	64	0,50	SIN
CG UPV 15-202	64	> 128	4	2	0,07	SIN	32	> 128	4	0,25	0,13	SIN
CG UPV 16-006	16	> 128	4	2	0,26	SIN	8	> 128	1	64	0,38	SIN
CG UPV 16-032	> 64	> 128	1	> 128	1,00	IND	> 64	> 128	4	> 128	1,03	IND
CK ATCC 6258	32	> 128	16	2	0,51	IND	32	> 128	32	0,25	1,00	IND
CK NCPF 3321	64	> 128	2	> 128	1,03	IND	64	> 128	32	0,25	1,00	IND
CK UPV 03-263	64	> 128	2	> 128	1,03	IND	32	> 128	1	128	1,50	IND
CN CBS 9983	16	> 128	4	2	0,26	SIN	16	> 128	2	64	0,38	SIN
CN CBS 9984	16	> 128	4	4	0,27	SIN	16	> 128	4	16	0,31	SIN
CO ATCC 96141	2	> 128	2	0,25	1,00	IND	2	> 128	2	0,25	1,00	IND
CO UPV 09-242	4	> 128	1	> 128	1,25	IND	2	> 128	2	0,25	1,50	IND
CP ATCC 22019	1	> 128	1	> 128	2,00	IND	2	> 128	1	> 128	1,50	IND
CP ATCC 90018	0,5	> 128	0,25	> 128	1,50	IND	0,5	> 128	0,25	> 128	1,50	IND
CP CDC 317	16	> 128	4	16	0,31	SIN	8	> 128	2	16	0,31	SIN
CP NCPF 3104	> 128	> 128	2	4	0,02	SIN	> 64	> 128	1	2	0,02	SIN
CP UPV 12-241	4	> 128	2	0,25	0,50	IND	1	> 128	1	0,25	1,00	IND
CP UPV 15-177	8	> 128	2	> 128	1,25	IND	4	> 128	4	0,25	1,00	IND
CT UPV 05-014	1	> 128	1	2	1,01	IND	1	> 128	1	2	1,01	IND
CT UPV 09-273	> 128	> 128	2	2	0,02	SIN	> 64	> 128	1	2	0,02	SIN

CA: *Candida albicans*; CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; CN: *Candida nivariensis*; CO: *Candida orthopsilosis*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*; IND: indiferente; INT: interpretación; SIN: sinergia. Se definió la interacción como sinérgica si el FICI era ≤ 0,5, indiferente entre 0,5 y 4, y antagonista si el FICI era > 4 (Odds F.C., 2013).

**Financiación.** Este estudio ha sido financiado por los proyectos GIC15/78 IT-990-16 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza) y UFI 11/25 (UPV/EHU).



**Figura 1** Curvas de letalidad de *Candida*. Cada punto representa los valores medios  $\pm$  la desviación estándar (barras de error). Circulo naranja, control (sin fármaco); triangulo verde, CsA sola; cuadrado azul, FLC solo; triangulo rojo, combinación de los dos fármacos. CA: *Candida albicans*. El estudio *in vitro* de la combinación de fármacos se interpretó de acuerdo con Sahuquillo et al. (2006), que define la sinergia como una disminución de las UFC/ml de  $\geq 2 \log_{10}$  en comparación con el fármaco más activo; indiferencia como disminución de UFC/ml <  $2 \log_{10}$  y antagonismo como aumento de las UFC/ml  $\geq 2 \log_{10}$ .

#### Bibliografía

- Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2477-82.  
Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52: 1.  
Sahuquillo Arce J, Colombo Gainza E, Gil Brusola A, Ortiz Estévez R, Cantón E, Gobernado M. In vitro activity of linezolid in combination with doxycycline, fosfomycin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*. 2006;19:252-257.

#### Novedades taxonómicas en el orden Mucorales

Emmanuel R. de Paz<sup>a</sup>, Dania García<sup>a</sup>, Josep Cano<sup>a</sup>, Josep Guarro<sup>a</sup>, Alberto Stchigel<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unitat de Micología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Correspondencia: Emmanuel R. de Paz. Tfno.: +34 689172671; correo electrónico: emmrodepaz@gmail.com

**Antecedentes.** El orden Mucorales incluye hongos mayormente saprobios, de crecimiento rápido, con hifas cenocíticas y abundante esporulación. Actualmente incluye 14 familias, aunque cuatro de ellas, Cunninghamellaceae, Lichtheimiaceae, Mucoraceae y Syncphalastraceae, muestran grandes incongruencias filogenéticas debido a una gran variabilidad fenotípica y molecular. Durante el estudio de la diversidad de los mucormicetos geófilos y coprófilos se obtuvieron un gran número de aislamientos que fueron identificados preliminarmente a nivel genérico dentro de las familias Cunninghamellaceae, Lichtheimiaceae y Mucoraceae. El examen de los caracteres morfológicos evidenció notables diferencias con los taxones previamente descritos, lo que nos condujo a pensar que podría tratarse de especies nuevas para la ciencia.

**Objetivos.** Contribuir al conocimiento de los hongos mucorales geófilos y coprófilos. Caracterizar fenotípica y molecularmente los aislamientos obtenidos. Determinar su relación filogenética en el orden Mucorales.

**Métodos.** Las muestras fueron recogidas en Argentina, España y México. Se procesaron por tres métodos: diluciones seriadas inoculadas en medios MEYE y DA, dispersión superficial en placa (*plate sprinkling*) y cámara húmeda. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C y revisadas bajo el microscopio estereoscópico. Los hongos fueron aislados en PDA, y la identificación morfológica se realizó

entre los 7-14 días de incubación a 25 °C. En la identificación molecular se utilizaron los marcadores ITS, LSU(28S) y MCM7. Para el análisis filogenético se utilizaron los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Se incluyeron 13 cepas tipo o de referencia.

**Resultados.** Se obtuvieron un total de 346 aislamientos; el 69% provenía de muestras de suelo y un 31% de heces. Se identificaron 14 géneros distribuidos en los órdenes Mucorales y Umbelopsidales. Los géneros aislados con mayor frecuencia fueron *Mucor* (n = 242), *Circinella* (n = 38), *Actinomucor* (n = 19), *Rhizopus* (n = 14) y *Absidia* (n = 12). El análisis filogenético concatenado de los genes ITS y LSU mostró que existe suficiente distancia filogenética para segregar los géneros *Circinella*, *Fennellomyces*, *Phascolomyces*, *Thamnostylum* y *Zychaea* de la familia Lichtheimiaceae. Se propone para ellos la nueva familia Circinellaceae. Los géneros *Rhizomucor* y *Thermomucor*, tradicionalmente considerados en Syncphalastraceae o *incertae sedis*, respectivamente, poseen suficientes diferencias genéticas y moleculares que nos permiten considerarlos como representantes de dos nuevas familias: Rhizomucoraceae y Thermomucoraceae. Un nuevo análisis concatenado ITS, LSU y MCM7 de los representantes de la familia Circinellaceae evidencia la existencia de cinco nuevos linajes para en el género *Circinella*, y que el género monotípico *Zychaea* incluye además dos nuevos taxones inicialmente relacionados con *Thamnostylum*. En el género *Thamnostylum* se observan dos nuevos linajes, uno formado por la especie tipo de *Fennellomyces* (se propone este género como sinónimo de *Thamnostylum*) y una nueva especie proveniente de heces de España. Además, dos aislamientos de *Absidia* y uno de *Lichtheimia*, muestran suficientes diferencias genéticas y morfológicas con las especies previamente descritas, por lo que podría tratarse de dos nuevas especies.

**Conclusiones.** Se propone tres nuevas familias en el orden Mucorales: Circinellaceae, Rhizomucoraceae y Thermomucoraceae. Se proponen ocho especies nuevas incluidas en los géneros: *Absidia* (1), *Circinella* (4), *Lichtheimia* (1), *Thamnostylum* (1) y *Zychaea* (1).

#### Estudio de las metaloproteínas en *Fusarium oxysporum* y su papel en la virulencia

Damaris Lorenzo, Javier Capilla, Loida López, Josep Guarro

Unitat de Micología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut i Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Correspondencia: Damaris Lorenzo Gutiérrez. Tfno.: +34 649324850; correo electrónico: damaris.lorenzo@urv.cat

**Antecedentes.** La deficiencia de Cu en mamíferos compromete la función del sistema inmune y sensibiliza al huésped frente a las infecciones microbianas. Se sabe que durante el proceso infeccioso los macrófagos elevan su concentración intracelular de Cu, lo que actúa sinérgicamente con otros efectores como las especies reactivas de O<sub>2</sub> para promover mayor daño oxidativo. Para combatir niveles elevados de Cu las bacterias y hongos oportunistas han desarrollado mecanismos para la detección y detoxificación de metales. Existen numerosas proteínas que participan en la homeostasis de metales, de las cuales destacan las metalotioneínas (Mt), proteínas intracelulares de bajo peso molecular ricas en cisteínas que mediante unión a metales pesados contribuyen a aumentar la tolerancia a Cu, Cd, Zn, Fe, etc. Algunos estudios en *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* señalan el papel de estas enzimas y otras proteínas transportadoras y reguladoras de metales en la virulencia (Festa et al., 2012), mientras que en otros hongos parecen no ser esenciales en la patogénesis (Tucker et al. 2004).

**Objetivos.** Identificación y estudio de las metalotioneínas y proteínas reguladoras de metales en *Fusarium oxysporum* mediante la generación de mutantes knockout y su posterior caracterización.

**Métodos.** Análisis *in silico* del genoma de *F. oxysporum* (cepa 4287) para la identificación de metalotioneínas y proteínas reguladoras

ortólogas a genes previamente identificados en otros hongos. Generación de mutantes defectivos en los genes de interés *mt1* (metalotioneína), *crpA* (transportador de Cu) y *aceA* (factor de transcripción) mediante mutagénesis dirigida y transformación de protoplastos de la cepa silvestre. Caracterización de las cepas mutantes generadas mediante evaluación de la sensibilidad en presencia de metales pesados y capacidad patogénica en un modelo murino de infección con ratones OF-1 neutropénicos.

**Resultados.** Generación de una cepa defectiva en la única metalotioneína identificada en el genoma de *Fusarium* ( $\Delta mt1$ ), defectiva en exportadora de cobre ( $\Delta CrpA$ ) con sus respectivas cepas complementadas. Los mutantes defectivos en dichos genes muestran una mayor sensibilidad frente a la presencia de metales pesados (Cd, Cu, Zn y Ag), compuestos oxidantes ( $H_2O_2$ ) y compuestos que interaccionan con la membrana (dodecil sulfato de sodio). Los ensayos preliminares en el modelo murino de infección mostraron una reducción de la virulencia en la cepa defectiva en el gen *mt1*.

**Conclusiones.** El gen *mt1* de *F. oxysporum* parece tener un papel relevante en la virulencia y la resistencia a los metales pesados. Futuros ensayos nos permitirán seguir avanzando en el estudio de la maquinaria de detoxificación del Cu y su homeostasis en este hongo patógeno oportunista de difícil tratamiento.

#### Eficacia de terapias combinadas en un modelo murino de infección sistémica por *Trichoderma longibrachiatum*

Dayana Dumas, Damaris Lorenzo, Katiuska Paredes, Josep Guarro, Javier Capilla

Unitat de Micología, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut i Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Correspondencia: Javier Capilla. Tfno.: +34 977759381; correo electrónico: javier.capilla@urv.cat

**Antecedentes.** *Trichoderma* es un hongo cosmopolita utilizado como agente de control biológico y productor de enzimas que puede dar lugar a infecciones graves en pacientes inmunosuprimidos. *T. longibrachiatum*, la especie más frecuentemente aislada en clínica, presenta en general una elevada resistencia a los antifúngicos, y aunque se han reportado valores de CMI de AMB y MCF bajas, la experiencia clínica y el tratamiento experimental en modelos animales han mostrado escasa eficacia.

**Objetivos.** Evaluar la actividad de las combinaciones AMB+MCF, AMB+VRC y MCF+VRC, así como sus eficacias en un modelo animal de infección diseminada por *T. longibrachiatum*.

**Materiales y métodos.** Estudios *in vitro*: se evaluó la actividad *in vitro* de las combinaciones AMB+VRC, AMB+MCF y MCF+VRC, mediante el método de tablero de ajedrez contra 19 cepas de origen clínico de *T. longibrachiatum*. La interacción entre fármacos se clasificó mediante el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI) en sinergia (FICI  $\leq 0,5$ ), indiferencia (FICI 0,5-4) o antagonismo (FICI  $\geq 4,0$ ). Estudios *in vivo*: Ratones OF-1 inmunosuprimidos con ciclofosfamida administrada i.p. a 200 mg/kg cada 5 días fueron inoculados i.v. con  $1 \times 10^7$  UFC/animal con dos cepas clínicas i.e., FMR 12627 y FMR 12492, seleccionadas por ser las que mostraron mayor sensibilidad a las combinaciones en el estudio *in vitro*. Se establecieron grupos de 16 animales, 8 para los estudios de supervivencia y 8 para realizar estudios de carga fúngica. Los tratamientos combinados consistieron en LAMB+MCF, LAMB+VRC Y MCF+VRC administrados como sigue: LAMB (i.v. a 20 mg/kg), VRC (p.o. a 25 mg/kg) y MCF (i.p. a 10 mg/kg). Todos los tratamientos se iniciaron 24 h postinfección y se administraron diariamente durante 8 días. La eficacia de los tratamientos se evaluó mediante el estudio de supervivencia a 20 días y la carga fúngica en pulmones, riñones, hígado, bazo y cerebro, 8 días postinfección.

**Resultados.** La combinación MCF+VRC fue la que mostró mayor sinergia (frente a 63,5% de cepas ensayadas) seguida de AMB+MCF (21,1%) y AMB+VRC (5,3%). En ningún caso se observó efecto antagonístico. En los estudios *in vivo* únicamente la combinación MCF+VRC incrementó la supervivencia de los animales ( $p=0,03$ ), sin embargo no se observó reducción significativa de la carga fúngica en ningún órgano estudiado. Las combinaciones de LAMB con MCF o VRC no mostraron eficacia en términos de supervivencia y únicamente LAMB+MCF redujo significativamente la carga fúngica en cuatro de los cinco órganos estudiados tras la infección con la cepa FMR 12627, pero no con la cepa FMR 12492.

**Conclusiones.** La combinación LAMB+VRC demostró ser inefectiva en el tratamiento experimental de la infección sistémica por *T. longibrachiatum*, mientras que el resto de combinaciones mostraron una modesta eficacia. Dado que MCF+VRC mostró beneficio únicamente en términos de supervivencia y LAMB+VRC en términos de reducción de carga fúngica, se hace difícil concluir cuál de las combinaciones aporta un mayor beneficio neto al curso de la infección. No hemos hallado una correlación entre los valores FICI obtenidos *in vitro* y la eficacia en la terapia experimental.