

Sesión 13: Evaluación de nuevos métodos, sistemas diagnósticos y de sensibilidad antimicrobiana

195

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA CASPOFUNGINA, LA ANFOTERICINA B, EL ITRACONAZOL Y EL VORICONAZOL SOBRE *ASPERGILLUS SPP*

M. Romero¹, E. Cantón¹, J. Pemán², R. Olivares y M. Gobernado²

¹Unidad de Microbiología Experimental. Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe de Valencia. ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Objetivos: El aumento de las infecciones fúngicas invasoras y los problemas de toxicidad y resistencia que plantean los tratamientos convencionales han llevado a la búsqueda de nuevos compuestos más tolerables y que no presenten resistencia cruzada con los ya existentes. La caspofungina puede ser una buena alternativa ya que presenta un mecanismo de acción diferente (inhibidor de la síntesis de glucano). En el presente trabajo se evalúa la actividad de la caspofungina sobre *Aspergillus spp.* y se compara con la de otros antifúngicos.

Material y métodos: Se estudió la actividad *in vitro* de la caspofungina, la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol sobre 20 cepas de *A. flavus* y 25 de *A. fumigatus*. La

actividad se determinó por microdilución en placa siguiendo las recomendaciones del CLSI, documento M38-A. En el caso de la caspofungina se determinó la concentración mínima efectiva o CME (mínima concentración que produce una inhibición parcial del crecimiento que se manifiesta microscópicamente como hifas más cortas y ramificadas). En el caso de la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol se determinó la CMI₀ (mínima concentración que produce una inhibición completa del crecimiento). Como control de calidad se utilizaron las cepas *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305. Se consideraron resistentes a la anfotericina B aquellas cepas que se inhibieron a concentraciones ≥ 2 mg/L.

Resultados: La caspofungina fue activa sobre las dos especies de *Aspergillus* (CME $\leq 0,5$ mg/L y la media geométrica [MG], 0,24 mg/L). La actividad fue mayor sobre *A. flavus* (MG 0,21 mg/L vs 0,27 mg/L). La anfotericina B mostró mejor actividad sobre *A. fumigatus* (MG 0,49 mg/L) que sobre *A. flavus* (MG 0,95 mg/L), especie en la que no se encontraron cepas resistentes. Una cepa de *A. flavus* fue resistente a la anfotericina B (CMI₀ 4 mg/L). La CME de la caspofungina para esta cepa fue 0,12 mg/L. La actividad del itraconazol fue similar para ambas especies (CMI₀ ≤ 1 mg/L). La CMI₀ del voriconazol fue > 1 mg/L en el 15,91% de las cepas, todas ellas de la especie *A. flavus*, sobre la cual su actividad fue menor (MG 1,19 mg/L vs. 0,43 mg/L en *A. fumigatus*).

Conclusiones: Cuando se utiliza la CME como criterio de punto final, la caspofungina es activa sobre las cepas de *Aspergillus* estudiadas. Su actividad es similar a la de la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol. La actividad del itraconazol es mayor que la del voriconazol y la de la anfotericina B.

196

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA CASPOFUNGINA SOBRE *ASPERGILLUS SPP*

M. Romero¹, E. Cantón¹, J. Pemán², R. Olivares y M. Gobernado²

¹Unidad de Microbiología Experimental. Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe de Valencia. ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Objetivos: La caspofungina es un antifúngico del grupo de las equinocandinas que ha demostrado poseer buena actividad *in vivo* sobre levaduras y hongos filamentosos. Debido al aumento de la prevalencia de las infecciones fúngicas invasoras, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, sería conveniente disponer de pruebas de sensibilidad *in vitro* que permitan detectar poblaciones resistentes y predecir la respuesta al tratamiento. En este trabajo se ha evaluado la influencia del medio de cultivo y del tiempo de incubación en la actividad *in vitro* de la caspofungina sobre dos especies de *Aspergillus*.

Material y métodos: Se estudiaron 45 aislamientos de *Aspergillus* procedentes de muestras clínicas de diferentes procedencias y pertenecientes a las especies *A. flavus* (20) y *A. fumigatus* (25). La actividad *in vitro* de la caspofungina se determinó siguiendo las recomendaciones del CLSI recogidas en el documento M38-A. Como medio de cultivo se empleó RPMI 1640, con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con MOPS 0,164 M y ajustado a pH $7 \pm 0,1$ (RPMI), y el mismo medio con un 2% de glucosa (RPMI-G). Como criterio de punto final se determinó la concentración mínima eficaz (CME), definida como la mínima concentración que produce una inhibición parcial del crecimiento que se manifiesta microscópicamente como cambios morfológicos (hifas más cortas y ramificadas), realizándose lectura visual de los resultados a las 24 y 48 horas de incubación. Las concentraciones de antifúngico ensayadas fueron de

64-0,12 mg/L y como control de calidad se utilizaron las cepas *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305.

Resultados: La media geométrica de la CME de la caspofungina sobre el total de cepas ensayadas, a las 24/48 horas, fue 0,22/0,24 mg/L en RPMI y 0,21/0,24 mg/L en RPMI-G. Aunque la actividad de la caspofungina sobre las dos especies estudiadas fue similar, en RPMI fue ligeramente mayor sobre *A. flavus* y en RPMI-G sobre *A. fumigatus*. La concordancia (± 2 Log) entre los tiempos de incubación y los medios de cultivo fue del 100%.

Conclusiones: Las pruebas de sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos a la caspofungina realizadas por el método M38-A muestran que es muy activa sobre *A. flavus* y *A. fumigatus* y que el tiempo de incubación y el medio de cultivo tienen escasa influencia en los resultados.

197

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE LA CASPOFUNGINA Y LA ANFOTERICINA B SOBRE LEVADURAS AISLADAS DE HEMOCULTIVO

M. Romero¹, E. Cantón¹, J. Pemán², R. Olivares y M. Gobernado²

¹Unidad de Microbiología Experimental. Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe de Valencia. ²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Objetivos: La caspofungina actúa impidiendo la síntesis de glucano mediante la inhibición de la β -1,3-D glucano sintasa. Este compuesto no está presente en las células humanas, lo que hace que su toxicidad sea menor que la de los antifúngicos utilizados hasta el momento para el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras como la anfotericina B o los azoles. En este trabajo se ha comparado la actividad in vitro de la caspofungina y de la anfotericina B sobre levaduras aisladas de hemocultivo.

Material y métodos: Se estudió la actividad in vitro de la caspofungina y de la anfotericina B sobre 190 cepas de levaduras procedentes de hemocultivos de las siguientes especies: *C. albicans* (46), *C. glabrata* (32), *C. guilliermondii* (11), *C. krusei* (21), *C. parapsilosis* (20), *C. tropicalis* (42) y grupo misceláneo (18). La actividad se determinó por el método de microdilución en placa según el documento M27-A2 del CLSI: inóculo 10^3 ufc/mL, medio de cultivo RPMI 1640 y lectura visual a las 48 horas de incubación. La CMI se definió como la concentración más baja de antifúngico que produce una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ (CMI₂) en el caso de la caspofungina o del 100% (CMI₀) en el caso de la anfotericina B. Como cepa control de calidad se incluyó *C. krusei* ATCC 6258. Se consideraron resistentes a la anfotericina B aquellas cepas que se inhibieron a concentraciones ≥ 2 mg/L.

Resultados: La CMI₂ de la caspofungina fue siempre ≤ 2 mg/L y la media geométrica (MG) para el total de cepas ensayadas 0,66 mg/L. Por especies, la actividad fue mayor sobre *C. albicans* (MG 0,26), *C. tropicalis* (MG 0,59) y *C. glabrata* (MG 0,65) y menor sobre *C. parapsilosis* (MG 1,62), *C. krusei* (MG 1,39) y *C. guilliermondii* (MG 1,07). La CMI₀ de la anfotericina B fue ≤ 1 mg/L en el 88,95% de las cepas ensayadas y aunque las diferencias entre especies fueron escasas, las más sensibles fueron también *C. albicans* (MG 0,4), *C. tropicalis* (MG 0,5) y *C. glabrata* (MG 0,55) y las menos *C. krusei* (MG 0,97), *C. guilliermondii* (MG 0,83) y *C. parapsilosis* (MG 0,71). La MG de la CMI₂ de la caspofungina sobre las cepas en las que la CMI₀ de la anfotericina B fue ≥ 2 mg/L fue ligeramente superior a la de las cepas sensibles (0,84 vs 0,60 mg/L).

Conclusiones: La caspofungina es activa sobre las cepas de levaduras consideradas como resistentes a la anfotericina B por lo que no parece existir resistencia cruzada entre ambos antifúngicos.

198

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD SEIMC PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HONGOS FILAMENTOSOS

R. Guna¹, N. Orta¹, J.L. Pérez^{1,3} y C. Gimeno^{1,2}

Programa de Control Externo de Calidad SEIMC¹. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina. Valencia². Servicio de Microbiología. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca³.

Objetivo: Evaluar los resultados obtenidos por el control externo de calidad SEIMC en la identificación de hongos filamentosos emergentes.

Material y métodos: Durante los años 1998 a 2006 se realizaron nueve envíos diferentes a una media de 200 centros y se compararon los resultados obtenidos por los participantes con los de un laboratorio de referencia. Los hongos remitidos fueron: *Microsporum canis*, *Fusarium solani*, *Trichophyton tonsurans*, *Penicillium marneffeii*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Sporothrix schenckii* y *Paecilomyces lilacinus*.

Resultados: El método diagnóstico usado de forma mayoritaria fue la observación microscópica con azul de lactofeno, además de la demostración de termodimorfismo en los casos en que procedía. Los porcentajes de identificaciones correctas en cuanto a género y especie fueron los siguientes: en *M. canis* el 92% identificó correctamente el género y el 91% también la especie, en *F. solani* el 84% el género y sólo el 5% la especie, en *T. tonsurans* el 95% el género y el 57% la especie, en *P. marneffeii* el 89% el género y 86% la especie, en *C. bertholletiae* el 68% el género y el 44% la especie, en *S. brevicaulis* el 90% el género y el 49% la especie, en *S. schenckii* el 92% el género y el 91% la especie y en *P. lilacinus* el 73% el género y el 40% la especie. El porcentaje de participación en cada uno de los controles se mantuvo alrededor del 85%, aunque en el control de *T. tonsurans* aumentó al 94%, situación que no se correlacionó con un mayor índice de acierto en la identificación de especie.

Conclusiones: En general, se observa que los porcentajes más bajos de acierto en la identificación de género y especie se obtuvieron con los hongos que presentaban una mayor dificultad diagnóstica, aunque se observan excepciones como la de *T. tonsurans*. Debemos resaltar que el 90% de los participantes que responden realizan un diagnóstico correcto de género, por lo que están capacitados para la identificación de hongos filamentosos emergentes. Al menos un 15% de los participantes en el control de calidad no responde de forma habitual cuando el hongo es filamentosos, porcentaje superior al que se observa cuando el hongo remitido es una levadura (alrededor del 9%), posiblemente en relación con una mayor dificultad diagnóstica y a la ausencia de métodos comerciales de apoyo.

199

PERFIL DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS DE FUSARIUM SPP IDENTIFICADOS MOLECULARMENTE

A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, A. Monzón y J.L. Rodríguez-Tudela

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

Objetivo: Conocer el patrón de sensibilidad a los antifúngicos en una colección de 67 aislados clínicos de *Fusarium*.

Materiales y métodos: Se incluyeron 67 cepas clínicas de *Fusarium* de distintos orígenes que fueron identificadas mediante estudio morfológico macro y microscópico y confirmadas con la secuenciación del factor de elongación a (EF1a). Como controles se incluyeron secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas del GENBANK. Las CMIs se obtuvieron mediante la metodología EUCAST para hongos filamentosos. Los anti-

fúngicos empleados fueron anfotericina B, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol y terbinafina. La identificación molecular se realizó mediante análisis filogenético con el programa InfoQuest FP 4.5 (Biorad), realizando el alineamiento de las secuencias y obteniendo el cladograma mediante parsimonia (maximum parsimony cluster analysis) con bootstrap de 1.000 y máxima probabilidad (maximum likelihood).

Resultados: En la colección de cepas clínicas se identificaron 22 *F. solani*, 13 *F. verticilloides*, 14 *F. oxysporum*, 14 *F. proliferatum*, 3 *F. equiseti*, y 1 *F. reticulatum*. La actividad de los azoles y terbinafina frente a todas las especies de *Fusarium* fue escasa, y así la CMI90 para *F. solani*, *F. verticilloides* y *F. proliferatum* fue > 8 mg/L. La CMI90 y la media geométrica para anfotericina B fueron respectivamente de 2 mg/L y 1,15 mg/L.

Conclusiones: 1) En esta colección de cepas clínicas, más del 50% de los aislados fueron especies reportadas con poca frecuencia en muestras humanas, 2) su identificación a nivel morfológico es difícil, lenta y requiere mucha experiencia por lo que actualmente la secuenciación del factor de elongación alfa se considera la técnica de elección; 3) En este estudio, la anfotericina B ha sido el único antifúngico que ha demostrado actividad frente a todas las especies de *Fusarium* con una media geométrica de 1,14 mg/L; 4) Los restantes antifúngicos tienen poca actividad aunque para algunos aislados las CMI pueden ser bajas, 5) Las nuevas técnicas de identificación molecular y la sensibilidad a los antifúngicos pueden ayudar a conocer la epidemiología de la infección fúngica en humanos mejorando el tratamiento de los pacientes.

200

EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE C. NEOFORMANS A FLUCONAZOL, ITRACONAZOL, VORICONAZOL Y POSACONAZOL

A.I. Aller, R.M. Claro, E. López-Oviedo, A. Romero y E. Martín-Mazuelos
S. Microbiología. Hospital Universitario Virgen de Valme. Sevilla.

Objetivo: a) Conocer la utilidad de los discos de Fluconazol (FC), Voriconazol (VR) y posaconazol (PS), y de las tabletas de itraconazol (IT) para determinar la sensibilidad de *C. neoformans*. b) Comparar los resultados obtenidos en la difusión en disco (DP) con los obtenidos por el método de microdilución en caldo (MDM).

Material y métodos: Se utilizaron 78 aislamientos clínicos de *C. neoformans*. La CMI fue determinada usando el método de MDM siguiendo las indicaciones del documento M27-A2 del CLSI y las modificaciones propuestas por Ghannoum (J Clin Microbiol. 1992; 30:2881-86). Los puntos de corte utilizados fueron: para FC los propuestos por Aller y cols (Antimicrob Agents Chemoter. 2000;44:1544-48), para IT los publicados en el CLSI y para VR los sugeridos por Pfaller y cols (J Clin Microbiol. 2006;44:819-26). Para PS no hay establecidos puntos de corte. Para la realización del DP se siguieron las especificaciones del CLSI (documento M44-A), utilizando los discos de FC (25 µg, Oxoid), VR (1 µg, Oxoid) y PS (5 µg, Oxoid), y la tableta de IT (10 µg, Rosco). Los puntos de corte para FC fueron los propuestos por el CLSI (documento M44-A) y para VR los sugeridos por Pfaller y cols. Para IT y PS no hay establecidos puntos de corte. La lectura de los dos métodos se realizó a las 48 y a las 72 h. de incubación. Como control de calidad se incluyeron las cepas *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. neoformans* ATCC 90112 y ATCC 90113. Para FC y VR se consideró un error muy grave cuando un aislamiento era Resistente (R) por MDM y Sensible (S) por DP; error grave cuando era S por MDM y R por DP; y error leve en el resto de los casos que no existió correlación.

Resultados: Para FC encontramos 2 errores muy graves, 2 graves y 4 leves, existiendo una correlación por ambos métodos del 97,1% para las cepas S y sólo del 50% para las cepas R. Para VR encontramos 2 errores muy graves, siendo la correlación del 94,7% para las cepas S y del 50% para las cepas R. Para IT del total de 7 cepas R sólo 2 presentaron un halo < 20 mm. Para PS del total de 8 cepas que presentaron la CMI más alta (1 µg/ml) ninguna presentó un halo < 20 mm.

Conclusiones: 1) El método de difusión en disco no parece ser adecuado para detectar las cepas de *C. neoformans* resistentes a los azoles estudiados. 2) Son necesarios más estudios antes de recomendar el uso de este método en la práctica clínica para la detección de aislamientos resistentes.

201

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS COMERCIALES, E-TEST Y SENSITITRE YEASTONE, PARA EL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD IN VITRO A ANFOTERICINA B DE HONGOS FILAMENTOSOS NO ASPERGILLUS

C. Martín de la Escalera¹, E. López-Oviedo¹, A.I. Aller¹, A.I. Martos¹, A. Romero¹, E. Cantón², P. García-Martos³ y E. Martín-Mazuelos¹
Servicio de Microbiología. ¹H.U. Valme (Sevilla). ²HU. La Fé (Valencia). ³H.U. Puerta del Mar (Cádiz)

Objetivo: Evaluar 2 métodos: Etest® (AB Biodisk, Solna, Suecia) y Sensititre YeastOne (SYO) (TREK Diagnostics System, Clevelan, OH) para el estudio de la sensibilidad(S) *in vitro* a Anfotericina B (AB) de hongos filamentosos no *Aspergillus*.

Material y método: Estudiamos 50 cepas: 20 Dematiaceos (D) (8 *S. apiospermum*, 5 *S. prolificans*, 1 *Rhinochlorella* spp, 1 *Curvularia* spp, 1 *Hortaea werneckii*, 1 *Bipolaris* spp, 1 *Phialophora* spp, 1 *Phoma* sp, 1 *Stachybotrys* spp), 14 Zigomicetos (Z) (5 *Rhizopus* spp, 3 *Mucor* spp, 1 *M. mimalis*, 1 *M. ramosissimus*, 1 *C. bertholletiae*, 1 *Absidia* spp, 1 *Syncephalastrum* spp). 16 Hiphomicetos hialinos(HH) (5 *Fusarium* spp, 2 *F. solani*, 1 *F. clamydosporum*, 1 *F. dimerum*, 1 *F. sobelutiaris*, 2 *S. fisca*, 1 *Paecilomyces* spp, 1 *Verticillium* spp, 1 *Trichoderma* spp, 1 *Artrografis* spp). Estudiamos la S con Etest® tiras de AB (0,002-32 µg/ml) en RPMI y SYO para AB (0,008-16 µg/ml). La lectura de la CMI fue a las 24 y 48 h en el punto donde se inhibió el 100% del crecimiento. Punto de corte arbitrario: 2 µg/ml (> 2 R ≤ 2 S). El grado de correlación (IC) se calculó en 1 rango de ± 2 diluciones. Cepas patrones *A. fumigatus* ATCC 204305 y *A. flavus* ATCC 204304.

Resultados: Rangos, MIC50 y MIC90 (µg/ml) a las 48 h, excepto Etest® de *Mucor* spp y otros(O)Z (*C. bertholletiae*, *Absidia* spp, *Sycephalostrum* spp) a las 24 h por sobrecrecimiento, respectivamente de cada especie: *S. apiospermum*: SYO: 1-2,1,2 Etest®, 2,2,2 *S. prolificans*: SYO:0,25-1, 0,5,1 Etest®;0,125- > 32,2, > 32. OD (*Rhinochlorella* sp, *Curvularia* sp, *H. werneckii*, *Bipolaris* sp, *Phialophora* sp, *Phoma* sp, *Stachybotrys* sp): SYO: 0,25-1,0,25,0,5 E-test®;1- > 32,1, > 32. *Rhizopus* spp: SYO: 0,125-1,0,25, 0,25 Etest®;2, 2, 2. *Mucor* spp: SYO: 0,008-0,25,0,25,1. Etest®: 0,008-2, 0,25,0,25. OZ: SYO: 1-2,1,1. Etest®: 0,125-1,0,25,0,25. *Fusarium* spp: SYO: 0,06-0,25,0,125, 0,125. Etest®: 0,06- > 32,0,25,2. OHH (*S. fisca*, *Paecilomyces* spp, *Verticillium* spp, *Trichoderma* sp, *Artrografis* spp): SYO: 0,125-1,0,25,1 E-test®, 0,008- > 32,0,5,4. El IC de los 2 fue: *S. apiospermum* 100%; *S. prolificans* 60%; OD 45%; *Rhizopus* spp 50%; *Mucor* spp 50%; OZ 75%; *Fusarium* spp 60% OHH 50%. En SYO crecieron a las 24 h menos del 50%.

Conclusiones: 1) SYO no detectó ninguna cepa con CMI > 2 ni a las 24 ni 48 h. 2) Etest® detectó CMI > 2, en cepas con conocida sensibilidad disminuida a AB, a las 48 h. 3) Más estudios son necesarios de correlación in vivo/ in vitro para evaluar los 2 métodos.

202

COMPARACIÓN DE SENSITITRE YEAST ONE VS MICRODILUCIÓN (M 38-A) PARA EL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD IN VITRO A POSACONAZOL DE HONGOS FILAMENTOSOS NO ASPERGILLUS

E. López-Oviedo¹, C. Martín de la Escalera¹, A. I. Aller¹, A. I. Martos¹, A. Romero¹, J. Pemán², P. García-Martos³ y E. Martín-Mazuelos¹

Servicio de Microbiología. H.U. Valme (Sevilla)¹, H.U. La Fé (Valencia)², H.U. Puerta del Mar (Cádiz)³.

Objetivos: Evaluar SensititreYeast One[®](S) para el estudio de sensibilidad "in vitro" a posaconazol de hongos filamentosos no *Aspergillus*, comparándolo con el método de referencia de microdilución CLSI M38-A (MD).

Métodos: Se estudiaron 50 cepas: 20 Dematiaceos [13 *Scedosporium* spp (8*S. apiospermum*, 5 *S. prolificans*), 1 *Rhinochloidiella* spp, 1 *Curvularia* spp, 1 *Hortaea werneckii*, 1 *Bipolaris* spp, 1 *Phialophora* spp, 1 *Phoma* spp y *Stachybotrys* spp], 16 Zigomicetos (8 *Rhizopus* spp, 3 *Mucor* spp, 1 *M. miemalis*, 1 *M. ramosissimus*, 1 *Cunninghamella bertholletiae* y 1 *Absidia* spp, 1 *Sycephalostrum* spp), 14 Hifomicetos Hialinos (5 *Fusarium* spp, 2 *F. solani*, 1 *F. clamydosporum*, 1 *F. dimerum*, 1 *F. sobelutinaris*, 1 *Scopulariopsis fissa* 1 *Paecylomyces* spp, y 1 *Verticillium* spp, 1 *Artrografis* spp). La MD siguió el documento M 38-A del CLSI (rango desde 0,015 a 8 µg/ml) y la lectura se realizó tras 48h. La lectura de S se realizó a 24 (S24) y 48 h (S48) (0,008-16 µg/ml). Los resultados se expresaron en Rango, CMI₅₀, CMI₉₀ (µg/ml) e índice de correlación (IC) (idénticas CMIs dentro de ± 2 diluciones).

Resultados: Mas del 50% de las cepas no crecieron en S24 por lo que se muestra sólo MD/ S48: Dematiaceos, Rango ≤ 0,015- > 8/≤ 0,008-0,5; MIC₅₀ 1/0,25; MIC₉₀ > 8/0,5. *S. apiospermum* Rango 0,03-1/0,06-0,5; MIC₅₀ -/-; MIC₉₀ -/-, *S. prolificans* Rango > 8/0,125- 0,5; MIC₅₀ -/-; MIC₉₀ -/-. **Zigomicetos** Rango 0,03-2/≤ 0,008-1; MIC₅₀ 0,25/0,25; MIC₉₀ 0,5/0,5. **Hifomicetos** Rango 0,03- > 8/≤ 0,008-0,12; MIC₅₀ > 8/0,016; MIC₉₀ > 8/0,12, *Fusarium* spp 0,128- > 8/≤ 0,008-0,016; MIC₅₀ -/-; MIC₉₀ -/-. IC (MD- S48) fueron: Dematiaceos 55% (*S. apiospermum* 75%, *S. prolificans* 0%), otros dematiaceos 85,7%, Zigomicetos 76,5% (*Rhizopus* sp 62,5%, *Mucor* sp 80%, otros 100%), Hifomicetos 0%.

Conclusiones: 1) S mostró IC > 75% en aquellas especies con CMI ≤ 1, e IC < 60% en aquellas especies con CMI ≥ 2 por MD a posaconazol, por tanto no parece un buen método para detectar CMI altas a este antifúngico. 2) Las CMIs por S fueron más bajas que las obtenidas por MD.

203

ESTUDIO "IN VITRO" DE LA ACTIVIDAD DE ANTIBIÓTICOS FRENTE A LEGIONELLA PNEUMOPHILA EN BIOFILMS Y FASE PLANCTÓNICA

A. Galar, M.E. Portillo, M. Íñigo, A. Serrera y J. Leiva
Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra.
Universidad de Navarra. Pamplona.

Introducción: *Legionella pneumophila* es un microorganismo que se adapta a las condiciones adversas, sobre todo cuando ha colonizado una superficie, formando una estructura que le confiere elevada resistencia denominada biofilm. Eritromicina y Levofloxacino son los antibióticos actualmente para tratar a las personas que sufren la enfermedad del legionario. En los casos más severos, se puede asociar Rifampicina.

Objetivo: Estudiar y comparar la actividad de distintos antibióticos frente a *Legionella pneumophila* en biofilm y fase planctónica.

Material y métodos: Se utilizó una cepa de *Legionella pneumophila* procedente de un aislamiento clínico. Par-

tiendo de un inóculo 0.5 Mc Farland se generaron biofilms de 48 horas (a 37°C) sobre placas microtiter de poliestireno de fondo plano. A continuación se inocularon en cada pocillo 100 µl de distintas diluciones (1-2000 µg/ml) de Claritromicina, Rifampicina, Levofloxacino, Cefazolina, Doxiciclina, Trimetropim-Sulfametoxazol, Gentamicina y Ceftriaxona. Tras 48 horas a 37°C, se realizaron tres lavados con suero fisiológico para retirar el antibiótico, se raspó el biofilm y se inocularon 10 µl de cada pocillo en placas BC-YE de enriquecimiento. A los tres días se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), bactericidas (CMB) y erradicadoras (CME) y se compararon con las calculadas mediante el mismo método sobre la bacteria en fase planctónica.

Resultados: Los antibióticos que presentaron mejor actividad frente a *Legionella* en fase planctónica fueron Levofloxacino y Doxiciclina. El único antibiótico que presentó buena actividad frente al biofilm de *Legionella* fue Rifampicina. La eficacia de Levofloxacino y Doxiciclina fue sensiblemente menor frente al biofilm de *Legionella*. Mediante este método, Claritromicina fue ineficaz frente a esta cepa en fase planctónica y biofilm.

Conclusiones: La técnica descrita es una herramienta útil para estudiar la actividad antimicrobiana frente a *Legionella pneumophila* en fase planctónica y en biofilm.

204

UTILIDAD DEL MEDCARD PYLORI PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI EN PACIENTES DISPÉPTICOS. RESULTADOS PRELIMINARES

M. Quesada^{1,2}, X. Calvet², S. Lario^{1,2}, A. Montserrat², N. Mateus², E. Brullet², R. Campo², F. Junquera², I. Sanfeliu³, I. Pons³, D. Fontanals³ y F. Segura¹
¹Servicio de Enfermedades Infecciosas, ²Unidad de Enfermedades Digestivas, ³Laboratorio de Microbiología, Hospital de Sabadell. Instituto Universitario Parc Taulí, Corporación Sanitaria Parc Taulí. Sabadell. Barcelona.

Introducción: La utilidad de las técnicas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* basadas en la detección de antígenos en heces varía de test a test. El objetivo del estudio fue evaluar la utilidad de un nuevo método rápido e inmunocromatográfico de captura de antígenos de *H. pylori* en heces que utiliza anticuerpos policlonales: MEDCARD PYLORI (Medimar, Italia) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en pacientes con dispepsia.

Métodos: Se incluyeron 100 pacientes sometidos a endoscopia para estudio de síntomas dispépticos. A todos ellos se les realizó la prueba del aliento expirado y se les tomaron biopsias para histología antral. Se consideraron infectados por *H. pylori* aquellos pacientes que presentaban ambos tests positivos, y no infectados aquellos con ambos tests negativos. Los pacientes con resultados discordantes fueron excluidos del análisis. El método de determinación de antígeno fecal de *H. pylori* se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calcularon la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN).

Resultados: Se tomaron en cuenta los resultados de 82 pacientes, 46 positivos y 36 negativos según la concordancia de ambas pruebas de referencia (18 pacientes tuvieron resultados discordantes). La sensibilidad, la especificidad, los VPP y VPN de MEDCARD PYLORI fueron de 87%, 52,8%, 70,2% y 76% respectivamente.

Conclusión: Los resultados preliminares obtenidos en 82 pacientes muestran que si bien la sensibilidad de MEDCARD PYLORI es aceptable, los valores de especificidad son bajos. Sería necesario evaluar el kit en una muestra más amplia de pacientes para confirmar los resultados.

205

EVALUACIÓN DE SYPHYLITOPTIMA PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A *TREPONEMA PALLIDUM* POR INMUNOCROMATOGRAFÍA

T. Sabalet, J. Rodríguez-Granger, A. Sampedro, J. Navarro-Marí y M. Rosa-Fraile
 Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

Introducción: El diagnóstico serológico de la sífilis se basa en la detección de anticuerpos (Ac) frente a cardiolipina y frente a *T. pallidum*. Normalmente en el screening de sueros se emplean técnicas de detección de Ac no específicos como el VDRL o el RPR. Estos test han de ser confirmados con métodos de detección de Ac específicos como la hemaglutinación (TPHA), inmunofluorescencia (FTA-ABS) o test de aglutinación de partículas (TPPA). Las técnicas de inmunocromatografía (IC) para detección de Ac específicos frente a *T. pallidum* permite detectar éstos en pocos minutos, no requiriéndose equipamiento adicional y con un mínimo entrenamiento del personal técnico. Objetivo Conocer la sensibilidad y especificidad del test inmunocromatográfico Syphilitop Optima (All Diag) para detección de anticuerpos específicos frente a *T. pallidum* usando el TPPA y VDRL como referencia.

Material y métodos: Muestras: Se han estudiado 114 sueros de seroteca de diferentes pacientes. 67 de ellos con TPPA positivo (22 sueros con VDRL positivo y 45 negativo) y 47 con TPPA negativo. A todos los sueros se les realizó el test SyphilitopOptima para detección de anticuerpos específicos frente a *T. pallidum* siguiendo instrucciones del fabricante. Todos los test de IC se interpretaron por dos observadores.

Resultados: De los 67 sueros con TPPA positivo, 60 fueron también positivos por SyphilitopOptima (89,5% de sensibilidad). La sensibilidad para muestras con TPPA y VDRL positivo fue similar que para sueros con TPPA positivo con VDRL negativo (86,3% y 88,8% respectivamente). Todos los sueros TPPA negativos fueron negativos por IC (100% especificidad). La concordancia en la lectura de resultados por ambos observadores para la IC fue del 100%.

Conclusión: La baja sensibilidad del test SyphilitopOptima respecto al TPPA a pesar de su fácil utilización no lo hacen apropiado para la detección de anticuerpos específicos frente a *T. pallidum*.

206

COMPARACIÓN DE MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA LA DETECCIÓN DE METALOBETALACTAMASAS EN UN LABORATORIO CLÍNICO

L. Moldes, M. Treviño, S. Cortizo, P.A. Romero y B.J. Requeiro
 Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Introducción: La resistencia a carbapenemas en bacilos gram negativos es un problema creciente, especialmente en *P. aeruginosa* y otros bacilos gram negativos no fermentadores. Aunque la producción de metalobetalactamasas (MBL) no es el mecanismo de resistencia más frecuente, su detección rápida es de gran interés, no sólo para el tratamiento adecuado de los pacientes sino para prevenir y controlar su diseminación ya que son enzimas plasmídicas fácilmente transferibles horizontal y verticalmente. La detección de los genes productores de MBL por técnicas moleculares es el método de referencia. No obstante, son procedimientos laboriosos y caros que no están al alcance de todos los laboratorios de microbiología y no son fáciles de incorporar a la rutina diaria.

Objetivo: Comparar tres métodos fenotípicos para la detección de MBL valorando su laboriosidad, reproducibilidad y dificultad de interpretación.

Material y métodos: Se ensayaron 77 cepas distintas de bacilos gram negativos con cmi a carbapenemas > 4 µg/mL aisladas de muestras clínicas durante 2.006 en el laboratorio de microbiología (62 *P. aeruginosa*, 5 *P. putida*, 1 *A. baumannii*, 1 *C. indologenes*, 1 *Brevundimonas vesicularis*, 1 *E. aerogenes*, 1 *E. coli*). La identificación y el antibiograma se hicieron mediante el sistema Vitek 2 (BioMérieux, Francia). Los métodos fenotípicos ensayados fueron: etest, test de sinergia imipenem-EDTA con doble disco descrito por Lee et al. y test con discos de imipenem y meropenem ± EDTA. Como controles se usaron las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 (negativo) y *S. maltophilia* y *P. aeruginosa* productora de VIM-2 (positivos).

Resultados: Ocho cepas fueron positivas por Etest, 9 por el método de sinergia y 42 por el método de carbapenem ± EDTA. Sólo dos aislamientos fueron positivos por los tres métodos simultáneamente.

Conclusiones: El método de Etest es el menos laborioso y fácil de interpretar. Sin embargo, es una técnica cara que debería ser usada para la confirmación de resultados y no para el cribado. Para este último fin recomendaríamos el test de sinergia con discos dada su buena concordancia con Etest y facilidad para interpretar sus resultados.

207

DETECCIÓN DE METALO-BETA-LACTAMASAS EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS FENOTÍPICOS

M. Íñigo¹, S. Sánchez², S. Hernández¹, M. Alonso¹, A. Serrera¹ y J. Leiva¹

¹Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona, ²Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra. Pamplona.

Introducción: La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los carbapenemas constituye un problema de importancia universal debido a la dificultad terapéutica que suponen y a su rápida propagación. Las carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas (MBLs) son las de mayor relevancia clínica por ser las que confieren mayor espectro de resistencia.

Objetivos: Evaluar 2 métodos fenotípicos para la detección de las MBLs: el denominado "Test bacteriológico EDTA-Imipenem" (EIM) y la técnica E-test determinando la proporción entre la CMI del Imipenem y la CMI del Imipenem+EDTA.

Material y métodos: Se estudiaron 30 cepas procedentes de aislamientos clínicos de nuestro centro hospitalario resistentes a carbapenemas, obtenidas entre los años 2003 y 2006. Para el ensayo EIM se analizaron los distintos extractos bacterianos obtenidos tras su crecimiento en medio líquido Luria-Bertani, lavado con Tris-HCl, pH 8,0, ultrasonicación y ultracentrifugación. Dicho extracto se combinó con ZnSO₄ (que estimula las MBLs) y con EDTA (que las inhibe). Como sistema indicador se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922, así como un control positivo con sólo extracto bacteriano y un control negativo con buffer Tris-HCl. Este ensayo se comparó con la técnica de E-test. En el método EIM se objetiva la producción de MBL por la potenciación del crecimiento de *E. coli* alrededor del disco "extracto bacteriano+ZnSO₄" y la inhibición alrededor del disco "extracto bacteriano+EDTA". En la de técnica E-test la presencia de MBL se refleja en una relación CMI Imipenem/CMI Imipenem+EDTA superior o igual a 8.

Resultados: La técnica E-test tan solo detectó 2 cepas productoras de MBL, suponiendo un 6,67% de las estudiadas, a diferencia del método EIM que detectó 9 cepas, por tanto, un 30% de las mismas.

Conclusión: La técnica EIM es un método adecuado para detectar las carbapenemasas MBL en *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, presenta una mayor sensibilidad que la técnica de E-test para la detección de este mecanismo de resistencia en este grupo de bacterias en auge.

**DISMINUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD
FRENTE A QUINOLONAS DE *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE* PRODUCTORAS
Y NO PRODUCTORAS DE BLEES TRAS EXPOSICIÓN
A VARIAS CONCENTRACIONES DE DIVERSAS
QUINOLONAS**

O. Noguera¹, J.C. Rodríguez², M. Ruiz², P. López²,
F. Loredó², L. Soler² y G. Royo^{2,3}

¹Hospital Vega Baja. Orihuela. Alicante. ²Hospital General
Universitario de Elche. Alicante. ³Universidad Miguel
Hernández. Elche. Alicante.

Objetivo: Se ha comunicado una mayor incidencia de cepas resistentes a fluoroquinolonas en cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para caracterizar este fenómeno, hemos desarrollado un modelo in vitro de exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de varias fluoroquinolonas que en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, productoras y no productoras de BLEE.

Material y métodos: *Cepas:* 2 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* sensibles a fluoroquinolonas, una de ellas productora de BLEE (CTX-M-9).

Antibióticos: Ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino
Determinación de la sensibilidad antibiótica: Se realizó mediante el sistema Wider (Soria Melguizo) con confirmación posterior por E-test (AB Biodisk).

Técnica utilizada para la generación de mutantes: Se generaron mutantes mediante exposición repetida (25 pases) a concentraciones constantes de las fluoroquinolonas durante 25 días. El experimento se realizó por triplicado, utilizando tres concentraciones distintas (0,015, 0,125 y 1 µg/ml). Los días 0, 5, 10, 15, 20 y 25 se dieron pases a placas de MH agar y se realizó la caracterización de los mutantes mediante la determinación de disminución de sensibilidad in vitro.

Resultados: En todos los casos, los mutantes generados presentaban una disminución de la sensibilidad antibiótica a todas las fluoroquinolonas, pero la cepa productora de BLEE genera mutantes más rápidamente (13,3 días de media) que la no productora de BLEE (14,4 días de media).

Al comparar la capacidad de generación de mutantes de las diferentes fluoroquinolonas, se observa que ciprofloxacino es la fluoroquinolona que genera mutantes más rápidamente (12,5 días de media versus 15 días de levofloxacino y 15,8 días de moxifloxacino).

Si analizamos los datos en función de la concentración de antibiótico utilizada en la generación de mutantes, se observa que las concentraciones más elevadas de fármacos generan mutantes más rápidamente (5,8 días de media frente a 15 y 20,8 días de media).

Discusión: Nuestros datos ayudan a explicar la mayor prevalencia de la resistencia a fluoroquinolonas en cepas productoras de BLEE y corrobora la necesidad de administrar las fluoroquinolonas a dosis suficientemente elevadas para que los niveles en el lugar de la infección sean adecuados para inhibir a las subpoblaciones más resistentes de este microorganismo.

**DIAGNÓSTICO DE *SARCOPTES SCABIEI* MEDIANTE
MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA**

J. Sahagún¹, L. Torres¹, C. Navarro¹, A.M. Morales²,
M.A. Concellón², A. Arias³ y F.J. Castillo³

¹Servicio de Microbiología y ²Servicio de Dermatología del
Hospital de Alcañiz. Teruel. ³Servicio de Microbiología del
H.C.U. Lozano Blesa. Zaragoza.

Introducción: El uso del microscopio de fluorescencia para el diagnóstico de la sarna fue descrito por primera vez por Bhutto *et al* en 1993. Observó que *Sarcoptes scabiei* mostraba autofluorescencia, tanto los adultos, como sus huevos e incluso de las envolturas de los mismos. Bhutto *et al* usaba glicerina para raspar las lesiones y observarlas con el microscopio de fluorescencia, las preparaciones así tomadas requerían una espera de una hora para observarlas con claridad.

Material y método: En el Servicio de Microbiología del Hospital de Alcañiz se examinaron con microscopio de fluorescencia (Nikon® ECLIPSE 80i) muestras de raspado de piel de las lesiones en forma de surco de dos pacientes con sospecha de sarna remitidos por el Servicio de Dermatología. Para montar las preparaciones del raspado de piel se usó aceite de inmersión en vez de glicerina.

Resultados: En ambos pacientes se pudieron observar mediante el microscopio de fluorescencia huevos y envolturas vacías de *Sarcoptes scabiei* que pasaron desapercibidas con el microscopio convencional. Además observamos cómo usando aceite de inmersión se puede ver la autofluorescencia de *Sarcoptes scabiei* sin necesidad de esperar a que se aclare la preparación.

Conclusiones: Creemos que el uso del microscopio de fluorescencia en raspados de piel con aceite de inmersión es especialmente útil para el diagnóstico de sarna. Sobre todo en los casos en los que, con el microscopio convencional, no se observan ácaros adultos de *Sarcoptes scabiei* ya que, si bien los ácaros adultos son fácilmente identificables, los huevos y sobre todo las envolturas de los mismos son casi transparentes y por lo tanto muy difíciles de identificar. En estos casos el uso del microscopio de fluorescencia puede aumentar sensibilidad del diagnóstico. Además el uso aceite de inmersión en vez de glicerina tiene la ventaja de poder observar la autofluorescencia de *Sarcoptes scabiei* sin necesidad de esperar una hora a que se aclare la preparación.