



IX Mycologic Forum- Asociación Española de Micología

IX Fórum Micológico-Asociación Española de Micología (AEM) Comunicaciones



¿Es *Malassezia pachydermatis* resistente a los antifúngicos?

Leyna Díaz Álvarez, M Rosa Bragulat Ararà, Gemma Castellà,
Mar Bardagí, F. Javier Cabañes

Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, España.
E-mail: Leyna.Diaz@uab.cat

Antecedentes. *Malassezia pachydermatis* es una levadura que forma parte de la microbiota normal de la piel de diversas especies de animales y que se caracteriza por ser lipodependiente. Sin embargo, en determinadas condiciones puede causar procesos patológicos como otitis y/o dermatitis en perros y gatos al proliferar en exceso. El control de estas patologías se basa en la administración de antifúngicos como el itraconazol y el ketoconazol, y raramente aparecen resistencias. De hecho sólo se conoce una cepa resistente a los azoles de esta especie, cuya resistencia se ha asociado a determinados cambios en el gen ERG11. No obstante, en algunas ocasiones, se han descrito casos en los que los animales no responden al tratamiento. Por ello, aunque actualmente no exista un método de referencia estandarizado para estas levaduras, consideramos necesario estudiar la sensibilidad de *M. pachydermatis* a estos antifúngicos.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es evaluar la sensibilidad de diferentes cepas de *M. pachydermatis* a diferentes antifúngicos. Asimismo, se analizará la presencia de cambios en la secuencia del gen ERG11 en una selección de las cepas estudiadas.

Métodos. Se seleccionaron un total de 90 cepas de *M. pachydermatis* aisladas de diferentes casos clínicos de otitis/o dermatitis en perros y gatos, incluidas cepas procedentes de dermatitis recidivantes, así como de animales sanos de diferentes especies animales (perro, gato, caballo, cerdo y vaca). Como controles se utilizaron las cepas de referencia *Candida parapsilopsis* ATCC 90028 y *Pichia kudriavzevii* ATCC 6258. Se evaluó la sensibilidad de las cepas seleccionadas frente a cuatro antifúngicos (itraconazol, ketoconazol, fluconazol y anfotericina B) mediante la técnica de difusión en disco (Neo-Sensitabs, Rosco) adaptando una técnica recomendada para levaduras (Cantón *et al.* 2009). Para ello, se utilizaron placas de Mueller-Hinton suplementado con un 2% de glucosa y azul de metileno. Las siembras se realizaron por duplicado mediante hisopos estériles y suspensiones a concentración 1 de

la escala de McFarland. Las placas se incubaron a 35 °C y las lecturas se realizaron a las 48,72 y 96 h. Asimismo, se determinó la sensibilidad de las cepas al itraconazol mediante la técnica de E-test (bioMérieux) en una selección de las cepas estudiadas. Este antifúngico es el que se emplea con más asiduidad en pequeños animales en España. Finalmente, se amplificó el gen ERG11, en cuatro fragmentos distintos con los primers ERG1S-ERG1R, ERG2S-ERG2R, ERG3S-ERG3R y ERG4S-ERG4R siguiendo la técnica descrita por Kano *et al.* (2019), en una selección de cepas.

Resultados. Los resultados preliminares muestran que mediante la técnica de difusión en disco, la lectura óptima para esta levadura es a las 72 h de incubación. Las cepas ensayadas hasta este momento han sido mayoritariamente sensibles a los antifúngicos ensayados. Al analizar las secuencias del gen ERG11 se han encontrado mutaciones en la mayoría de las cepas estudiadas.

Conclusiones. Con la adaptación de la técnica de difusión en disco para esta especie de levadura, todas las cepas estudiadas hasta el momento, incluidas las de casos recidivantes de dermatitis, han resultado ser mayoritariamente sensibles a los antifúngicos ensayados. No obstante, se requieren más estudios para determinar si las mutaciones detectadas en el gen ERG11 se relacionan con la resistencia a los azoles o simplemente reflejan la variabilidad intraespecífica presente en este gen en *M. pachydermatis*.

Primeros resultados de un estudio de micetoma en Turkana (Kenia)

David Ferrández¹, Laura Ramírez¹, Consuelo Ferrer¹,
Carmen Hernández², M^a Francisca Colom¹

¹Laboratorio de Micología Médica, Universidad Miguel Hernández;
²Cirugía en Turkana, Departamento de Cirugía, Universidad Complutense de Madrid. E-mail: david.ferrandez02@gmail.com

Antecedentes. El micetoma es una infección crónica del tejido subcutáneo y tejidos blandos. Comienza con una lesión nodular indolora que evoluciona lentamente invadiendo tejidos profundos (incluido hueso) y genera importante invalidez. En estadios avanzados suele precisar la amputación de los miembros. En 2016 fue reconocida como una de las enfermedades tropicales «abandonadas» por la OMS.

Objetivos. El objetivo es evaluar la prevalencia del micetoma en el condado de Turkana (noroeste de Kenia), y describir los agentes causales involucrados y su posible origen en el medio ambiente.

Métodos. Basándonos en datos previos del equipo de medicina cooperativa *Cirugía en Turkana*, en 2019 comenzamos un estudio del micetoma en esta región. Se tomaron muestras de pacientes con lesiones sospechosas que firmaron el consentimiento informado y facilitaron datos clínicos y demográficos. Las muestras se obtuvieron principalmente por biopsia y se sembraron en medios generales para desarrollo de hongos y bacterias. Se realizó extracción de ADN de los aislamientos con dos sistemas comerciales y amplificación por PCR e identificación mediante herramientas bioinformáticas. A su vez, se recogieron muestras del medio ambiente (suelos y vegetación) y se les realizó el mismo estudio.

Resultados. Se obtuvieron 11 muestras clínicas de pacientes varones de entre 13 y 70 años y 24 muestras de medio ambiente. Las lesiones estaban fundamentalmente localizadas en los pies (91%). Tres de los pacientes tenían granos negros en el exudado de los nódulos y 6 granos de color blanquecino amarillento. Se confirmaron dos casos de eumicetoma por *Madurella mycetomatis* y dos casos de actinomycetoma por *Cellulosimicrobium cellulans*. De las muestras de medio ambiente se identificaron diversos géneros y especies fúngicas (*Aspergillus flavus*, *Paecilomyces formosus*, *Fusarium verticillioides*, *Cladosporium halotolerans*, *Aspergillus terreus* y *Trichosporon* spp.), además de un morfotipo de *Madurella mycetomatis* a falta de confirmación por biología molecular.

Conclusiones. La detección de *Aspergillus flavus* o *Fusarium verticillioides* en muestras de ambiente demuestra la presencia de agentes causales de micetoma en la región de Turkana. La obtención del morfotipo de *Madurella mycetomatis* es un indicio de la presencia en ambiente. El hallazgo de *Cellulosimicrobium cellulans* en dos muestras clínicas es un resultado muy significativo ya que es una actinobacteria que no ha sido descrita antes como agente causal de micetoma. Es necesario tomar y analizar muchas más muestras y mejorar el método de trabajo para localizar la fuente de infección y describir con precisión los riesgos de enfermedad y posibilidades de prevención en Turkana.

Tres nuevas especies del género *Curvularia* de origen clínico y ambiental

Isabel Iturrieta-González¹, Josepa Gené¹, Nathan Wiederhold², Dania García¹

¹Unidad de Micología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, Reus, España; ²The Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA. E-mail: isabeliturrieta@gmail.com

Antecedentes. El género *Curvularia* incluye hongos dematiáceos, ubicuos, saprófitos, o patógenos de plantas y animales. En el hombre se ha asociado a infecciones leves de piel y uñas, y a pesar de que la patología más común es la sinusitis alérgica también se han descrito diversos casos de feohifomicosis cerebral o del sistema nervioso central. En los últimos años, y gracias al análisis de secuencias de ADN, se ha demostrado que la morfología conidial no es un criterio válido para la correcta delimitación del género, así como para la diferenciación entre especies. En consecuencia, el análisis de secuencias de la región ITS del ADNr, así como de fragmentos de los genes *gapdh* y *tef1*, resulta imprescindible para una correcta identificación y un abordaje más natural de la taxonomía de este género.

Objetivos. Realizar un estudio polifásico para la identificación de aislamientos clínicos y ambientales del género *Curvularia*.

Métodos. Cinco aislamientos morfológicamente identificados como *Curvularia* spp. obtenidos de muestras clínicas humanas de USA, suelo de México y restos vegetales procedentes de Vietnam e Indonesia, fueron caracterizados macro y microscópicamente por medio de agar patata dextrosa, agar harina de avena y agar patata-zanahoria incubados a 25 °C en oscuridad durante 7 días. La identificación molecular se realizó utilizando tres marcadores ITS, *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 Kimura 2 parámetros con distribución Gamma y sitios invariantes.

Resultados. El análisis multigénico de los cinco aislamientos mostró que estos representaban tres potenciales nuevas especies, todas ellas filogenéticamente relacionadas y agrupadas en un único clado estadísticamente soportado, que incluía además tres especies previamente descritas, *C. petersonii*, *C. americana* y *C. verruculosa*. Los dos aislamientos clínicos representaban una única especie que se propone como *C. suttoniae* sp. nov. Los aislamientos de material vegetal resultaron genética y morfológicamente muy similares entre ellos, por lo que se proponen como *C. vietnamensis* sp. nov. Ambas especies estaban filogenéticamente más relacionadas con *C. petersonii*, de la que además se diferenciaban morfológicamente por la ornamentación y el tamaño del conidio. Por otro lado, el aislamiento de suelo procedente de México resultó genéticamente más relacionado con *C. verruculosa* y *C. americana*. Sin embargo, éste conformaba un único linaje distante de las especies indicadas y morfológicamente se podía diferenciar de *C. verruculosa* por la producción de conidios de menor tamaño, y de *C. americana* por tener conidios verrucosos y de mayor tamaño. Debido a la estrecha relación filogenética de la cepa mexicana con *C. verruculosa*, ésta se propone como *C. paraverruculosa* sp. nov.

Conclusiones. El análisis polifásico de las cepas estudiadas nos ha permitido delimitar tres nuevas especies para el género *Curvularia*.

Inhibición de *Botrytis cinerea* a bajas temperaturas mediante bacterias antárticas: un modelo de estudio para el control del deterioro alimenticio en postcosecha

Matías Poblete-Morales¹, Javier Capilla²,

Claudia Rabert¹, Gino Corsini¹, Evelyn Silva-Moreno¹⁻³

¹Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile; ²Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili e Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Tarragona, España; ³Centro Regional de Investigación La Platina. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Santiago, Chile. E-mail: matias.poblete@uautonoma.cl

Antecedentes. *Botrytis cinerea* es uno de los principales problemas fitosanitarios en Chile y el mundo. Las pérdidas en postcosecha en uva pueden alcanzar el 30% a pesar de los protocolos de manejo. Por otra parte, el uso de fungicidas químicos ha perdido aceptación dentro de los consumidores, inclusive previo a la cosecha, ya que su abuso ha generado aparición de aislamientos resistentes y problemas medioambientales. Por ello es imprescindible el desarrollo de nuevas y más eficientes estrategias para el control. Una alternativa a los métodos convencionales es el uso de biocontroladores. El problema principal de éstos es su reducida efectividad a bajas temperaturas. El estudio de microorganismos extremófilos antár-

ticos es un atractivo foco de investigación para el descubrimiento de agentes biocontroladores con capacidad antimicrobiana a bajas temperaturas.

Objetivos. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar bacterias antárticas capaces de controlar *B. cinerea*, a baja temperatura, mediante la producción de compuestos volátiles.

Métodos. Se realizó un aislamiento desde muestras de suelo antártico asociados a rizosfera de *Deschampsia antarctica* (pasto antártico). Luego se evaluó la actividad antifúngica, mediante antagonismo en cultivo dual y la inhibición mediada por compuestos volátiles, frente a cepas resistentes de *B. cinerea*. Las bacterias productoras se caracterizaron mediante pruebas microbiológicas y de biología molecular. Finalmente se determinaron los compuestos volátiles producidos por GC-masa y se evaluó la defensa *in vitro* ejercida por los compuestos volátiles bacterianos sobre uvas.

Resultados. Se obtuvieron un total de 54 aislamientos bacterianos, de los que 20 presentaron actividad contra *B. cinerea* en condiciones de baja temperatura, similares al almacenamiento postcosecha. Los cinco aislamientos con mayor capacidad de inhibición pertenecen al género *Pseudomonas*, de acuerdo con el análisis de 16S rDNA. La secuenciación y análisis del genoma de uno de los cinco aislamientos arrojó la especie *Pseudomonas yamanorum*, previamente aislada asociada a rizosfera en ambientes extremos. Ensayos *in vitro* muestran inhibición del crecimiento micelial y en las estructuras reproductivas de *B. cinerea*, inhibición mediada por los productos volátiles producidos por este aislado bacteriano.

Conclusiones. Estos resultados sugieren el potencial uso de estas bacterias antárticas como biocontroladores, así como para la identificación de nuevas moléculas con propiedades para el control del hongo *B. cinerea* en condiciones de baja temperatura.

Agradecimientos FONDEF ID17A10007 y beca doctorado Universidad Autónoma de Chile

Taxonomía y filogenia de hongos dulceacuícolas de España

Viridiana Magaña Dueñas, José F. Cano, Alberto M. Stchigel
Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut i IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España. E-mail: viridiana.magana@urv.cat

Antecedentes. Los ambientes acuáticos albergan una gran diversidad de organismos, entre ellos los hongos, que tienen un importante papel ecológico en la descomposición y reciclaje de detritos orgánicos. Los hongos de agua dulce de España han sido poco estudiados, con excepción de los hongos «ingoldianos» y, de forma esporádica, los aero-acuáticos. España presenta un gran número de lagos y ríos, y una elevada diversidad vegetal, motivos que hacen sospechar de la existencia de un gran número de especies fúngicas todavía por descubrir.

Objetivos. Aislar e identificar de aguas dulces hongos, principalmente ascomicetos con reproducción asexual (hifomicetos y celomicetos) y sexual, a partir de material vegetal en descomposición en ríos y lagos de España.

Métodos. Se procesaron muestras de material vegetal sumergido proveniente de Les Guilleries (Barcelona), Capafonts (Tarragona) y Serra del Montsant (Tarragona). El material fue introducido en cámaras húmedas (empleando agua con dieldrin y cloranfenicol para evitar la propagación de ácaros y bacterias, respectivamente), y estas fueron incubadas a temperatura ambiente. Las cámaras húmedas fueron observadas periódicamente durante dos meses, y los taxones interesantes se aislaron en cultivo puro. Posteriormente, se realizó un estudio fenotípico y genotípico (mediante

secuenciación de la región ITS y LSU) con la finalidad de identificarlos.

Resultados. Se aislaron un total de 115 cepas, 65 de las cuales fueron secuenciadas, identificadas molecularmente mediante BLAST y sometidas a un análisis filogenético. Se identificaron los siguientes taxones: *Dendroclathra lignicola*, *Diaporthe eres*, *Didymella macrosoma*, *Didymella pinodella*, *Fusarium ciliatum*, *Jalapriya pulchra*, *Lentithecium aquaticum*, *Menispora ciliata*, *Neonectria lugdunensis*, *Phoma herbarum*, *Phomatoides nebulosa*, *Pyrenochaeta acicola*, *Reticulascus clavatus*, *Stachybotrys dichroa*, *Torula herbarum* y *Voluella rosae*. Varias cepas de los géneros *Murispora*, *Spirosphaera* y *Xylomyces* no han podido ser identificadas a nivel de especie, motivo por el cual son propuestas como taxones nuevos para la ciencia.

Conclusiones. Mediante análisis de secuencias nucleotídicas y de caracteres morfológicos, se proponen cinco nuevos taxones para la ciencia.

Caracterización molecular y epidemiológica de un brote de *Candida auris* en un hospital español

Elías Cortés Acosta^{1,4}, Asunta Martínez Martínez^{1,3}, Alba Ruiz Gaitán^{1,2}, Eulogio Valentín Gómez^{1,3}, Javier Pemán^{1,2}
¹Grupo de Infección Grave. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia; ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Politécnico La Fe, Valencia; ³Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias de Biológicas, Valencia; ⁴Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología, Valencia, España. E-mail Elías Cortés: elias.krsp@gmail.com

Antecedentes. *Candida auris* es un patógeno fúngico emergente con resistencia a la mayoría de los antifúngicos sistémicos disponibles. En la actualidad esta especie es considerada una amenaza mundial debido a su gran transmisibilidad y a su capacidad de sobrevivir en ambientes hospitalarios. El brote por *C. auris* en el Hospital Universitario Politécnico La Fe en Valencia (España) tuvo su inicio en el año 2016 y, hasta la fecha, es el más importante de los declarados en el mundo.

Objetivos. Establecer la filogenia de los aislamientos del brote de *C. auris* en nuestro hospital.

Métodos. Se incluyeron 111 aislamientos de *C. auris* procedentes de hemocultivo (100 España, 2 Colombia, 1 Corea, 2 Brasil, 2 Omán, 2 Japón y 2 Venezuela) y 8 cepas de control; *C. albicans* CS5314, *C. haemulonii*, *C. psedohaemulonii*, *C. dubushaemulonii*, *C. tropicalis* BIOCAN10, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): las reacciones PCR-RAPD se realizaron mediante el kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads® (Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, NJ, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Cada reacción se realizó con 50 ng/μl de ADN genómico, 1 μmol oligonucleótido y agua libre de nucleasas, en un volumen final de 25 μl. Los oligonucleótidos utilizados, incluidos en el kit, fueron M2 (5'-CTTGATTGCC-3') y P4 (5'-AAGAGCCCGT-3'). Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en diferentes días. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE 1X a 150 V/3 h. El gel se reveló con GelRed® (0,5 mg/ml) y se visualizó bajo transiluminación UV (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA®). Los perfiles RAPD se analizaron utilizando el software Bionumerics® v. 7.6 (Applied Maths®) para generar un dendrograma UPGMA.

Resultados. La caracterización molecular de los aislamientos clínicos españoles de *C. auris* presentan al menos 10 diferentes patrones de bandas, relacionados entre sí en un 50 y 80% de similitud. Del total de 100 aislamientos se formaron 4 clados (A al D). El 40% se

agruparon en el clado A con un 75% de similitud, el 8% formó el clado B con un 80% de similitud, el 24% el clado C con un 80% de similitud y el 8% de los aislamientos formaron el clado D con un 85% de similitud.

Conclusiones. 1. El brote de *C. auris* es, aparentemente, de índole nosocomial. Sin embargo, se observó una relación con los aislamientos de *C. auris* provenientes de Omán. 2. La técnica de RAPD permite caracterizar de manera preliminar los aislamientos en una situación de brote epidémico debido a su rapidez y fácil ejecución; sin embargo, los resultados obtenidos deben ser confirmados por herramientas de tipificación más robustas como PFGE o secuenciación masiva.

Eficacia de la combinación de anfotericina B con equinocandinas contra *Candida auris*

Ainara Hernando¹, Estibaliz Mateo¹, Elena Eraso¹, Javier Pemán², Guillermo Quindós¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, UPV/EHU, Bilbao, España; ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia. E-mail: ainara.hernando@ehu.eus

Antecedentes. *Candida auris* es un patógeno emergente global que causa candidiasis invasivas con alta mortalidad y presenta multirresistencia a los fármacos antifúngicos.

Objetivos. Evaluar la actividad de la combinación de anfotericina B con anidulafungina, caspofungina o micafungina contra *C. auris* in vitro e in vivo.

Métodos. Se utilizaron dos aislamientos de *C. auris* de hemocultivo del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia). Los fármacos se dispensaron en placas de 96 pocillos con gradientes de concentraciones de anfotericina B entre 0,015 y 1 µg/ml y de las equinocandinas entre 0,015 y 8 µg/ml en tablero de ajedrez. Los valores se analizaron mediante la teoría aditiva de Loewe: FICI=CMI de A en combinación/CMI A en monoterapia+CMI de B en combinación/CMI de B en monoterapia. Un valor FICI ≤ 0,5 se consideró sinérgico. Los estudios in vivo se realizaron infectando la cepa de *Caenorhabditis elegans* AU37 (*glp-4[bn2]*; *sek-1[km4]*) con ambos aislamientos de *C. auris*, incubados a 25 °C y valorando la supervivencia cada 24 h hasta las 120 h. Se determinaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se estimaron las diferencias con la prueba log-rank ($p < 0,05$).

Resultados. Las combinaciones de anfotericina B con las tres equinocandinas fueron sinérgicas (Tabla 1). El efecto de la combinación de anfotericina B con la anidulafungina y con la caspofungina fue similar contra los dos aislamientos, mientras que en la combinación de anfotericina B y micafungina se detectaron valores de CMI diferentes. *C. auris* causó una alta mortalidad de *C. elegans*. Los tratamientos antifúngicos redujeron la mortalidad del 4-69%. En los nematodos infectados con el aislamiento 17-257 la supervivencia más alta se observó con anfotericina B más anidulafungina (Tabla 2). Este tratamiento era más eficaz que la monoterapia con anfotericina B ($p < 0,05$), pero similar a la monoterapia con anidulafungina. En la infección con el aislamiento 17-267, la supervivencia más alta se observó con la combinación de anfotericina B y caspofungina, que fue más eficaz que la monoterapia con anfotericina B o caspofungina ($p < 0,05$). La supervivencia de los nematodos no superó el 35% después de ser tratados con las combinaciones de anfotericina B y micafungina.

Conclusiones. La anfotericina B en combinación con cualquiera de las tres equinocandinas tuvo un efecto sinérgico in vitro contra *C. auris*. Las combinaciones de anfotericina B con anidulafungina y

con caspofungina fueron las más exitosas en el tratamiento de la candidiasis experimental en *C. elegans*.

Evaluación de la capacidad fungicida o fungistática de dos desinfectantes para la eliminación de *Candida auris*

Elías Cortés Acosta^{1,4,5}, Ignacio Baeza García^{1,3}, Alba Ruiz Gaitán^{1,2}, Eulogio Valentín Gómez^{1,3}, Emilia Cantón Lacasa¹, Javier Pemán^{1,2}
¹Grupo de Investigación Infección Grave. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia; ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Politécnico La Fe, Valencia; ³Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias de Biológicas, Valencia; ⁴Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología, Valencia, España; ⁵Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciudad de México, México. E-mail: elias.krsp@gmail.com

Antecedentes. *Candida auris* es una especie, multirresistente, difícil de identificar y de elevada transmisibilidad y mortalidad. Se han descrito en el mundo 8 brotes de candidiasis invasora por *C. auris*, pero ninguno ha tenido la magnitud del descrito en el Hospital Universitario i Politécnico La Fe en abril de 2016. *C. auris* se ha aislado de manos del personal sanitario, quirófanos, dispositivos médicos, en el entorno del paciente y es resistente a los desinfectantes habituales del entorno sanitario.

Objetivos. Evaluar la actividad de dos nuevos desinfectantes sobre *C. auris* y otras especies de *Candida*.

Métodos. Desinfectantes: MCS Yellow (Medical Chlorine Solution, MEDIPAL®) contiene 5000 ppm de ion cloruro y MDS (Medical Desinfectant Solution, MEDIPAL®) que contiene 10000 ppm de amonio cuaternario.

A) Para determinar el porcentaje de letalidad de los desinfectantes sobre *C. auris* VPCi, se utilizó la técnica de Milles & Misra, se ensayaron diferentes concentraciones de ambos productos (100%, 75%, 50%, y 25%) a los 2, 5 y 10 min, en ausencia y en presencia de materia orgánica (1% peptona).

B) La capacidad fungicida y fungistática se evaluó en 8 cepas de *C. auris* aisladas en diferentes países (2 España, 1 Colombia, 1 India, 1 Brasil, 1 Japón, 1 Corea, 1 Omán), 2 *C. albicans* (CS5314 y ATCC90028), 2 *C. tropicalis* (BIOCAN10 y ATCC750), 2 *C. parapsilosis* (CP563 y ATCC22019), 1 *C. glabrata* ATCC 90030 y 1 *C. krusei* ATCC6258. Para ello se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y fungicida (CMF) del ion cloruro y de amonio cuaternario mediante microdilución en placas de 96 pocillos. Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo de 24 h en Agar YPD y se ajustó al 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/ml). La CMF se determinó sembrando 10 µl de la CMI en placas de agar YPD, incubando 24 h a 37 °C.

Resultados.

A) MDS al 50% eliminó el 100% de las células de *C. auris* VPCi (India) a los 5 min, mientras que el MCS Yellow a la misma concentración necesitó 10 min para tener el mismo efecto.

B) El intervalo de CMIs del desinfectante MDS para todos los aislamientos de *C. auris* fue de 250 a 1000 ppm. Las CMIs para los aislamientos españoles de *C. auris* fueron más elevadas (500-1000 ppm). Las CMIs de MCS Yellow oscilaron entre 63 y 500 ppm para todas las *C. auris*, siendo más elevada (500 ppm) en las cepas españolas. Para el resto de especies ensayadas las CMIs de MCS Yellow fue de 125 a 500 ppm, siendo *C. krusei* ATCC6258 la especie más sensible. La CMF de ambos desinfectantes fue entre dos y cuatro veces la CMI para todos los aislamientos.

Conclusiones. El desinfectante MDS fue más activo que el MCS Yellow sobre las 16 cepas ensayadas, tanto por CMI como por el tiempo de eliminación para el 100% de las células. Los aislamientos clínicos españoles de *C. auris* son más resistentes a los desinfectantes ensayados que las cepas de otro origen geográfico.

Tabla 1. Sensibilidad in vitro de la combinación de anfotericina B (AmB) con anidulafungina (AND), con caspofungina (CSP) y con micafungina (MCF) frente a *C. auris*

Aislamiento	Combinación	CMI ₉₀ (µg/ml)				FICI	Interacción
		AmB en monoterapia	Equinocandina en monoterapia	AmB en combinación	Equinocandina en combinación		
17-257	AmB + AND	0,5	>8	0,03125	1	0,125	Sinérgica
	AmB + CSP	0,5	>8	0,03125	1	0,125	Sinérgica
	AmB + MCF	0,5	>8	0,03125	0,25	0,078	Sinérgica
17-267	AmB + AND	0,5	>8	0,03125	1	0,125	Sinérgica
	AmB + CSP	0,5	>8	0,03125	1	0,125	Sinérgica
	AmB + MCF	0,5	>8	0,06250	0,5	0,156	Sinérgica

Tabla 2. Supervivencia de nematodos infectados con *C. auris* y tratados con las combinaciones ensayadas in vitro de anfotericina B (AmB) con anidulafungina (AND), caspofungina (CSP) y micafungina (MCF)

Antifúngico	Concentración (µg/ml)	Supervivencia de <i>C. elegans</i> (%)	
		Infectados con UPV 17-257	Infectados con UPV 17-267
AmB	0,03125	27	6,6
AmB	0,0625	31,2	11,2
AND	1	70,5	58,5
CSP	1	63,1	67,2
MCF	0,25	11,7	-
MCF	0,5	-	14,6
AmB + AND	0,03125/1	69	69,4
AmB + CSP	0,03125/1	56,8	79,9
AmB + MCF	0,03125/0,25	35	-
AmB + MCF	0,0625/0,5	-	26,6
Controles de <i>C. elegans</i>			
Sanos	100	100	
Infectados sin tratamiento	23,4	10,3	

(-) Estas combinaciones no se probaron.

Reidentificación de *Candida duobushaemulonii* asociada a infección superficial y con sensibilidad reducida a los azoles

Irene Jurado-Martín¹, Cristina Marcos-Arias¹, Estibaliz Varela-Echegaray¹, Piet de Groot², Guillermo Quindós¹, Elena Eraso¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Bilbao, España; ²Regional Center for Biomedical Research, Castilla-La Mancha Science & Technology Park, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España. E-mail: irenejurado06@gmail.com

Antecedentes. Las candidiasis causadas por *Candida auris*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida haemulonii* y *Candida pseudohaemulonii*, especies filogenéticamente relacionadas con sensibilidad reducida a los fármacos antifúngicos, están aumentando. Sin embargo, los métodos de diagnóstico convencionales no identifican correctamente estas especies, por lo que su prevalencia puede estar subestimada.

Objetivos. Utilizar nuevas técnicas moleculares para identificar correctamente aquellos aislamientos de la colección de cultivos de la UPV/EHU con identidades dudosas, que podrían pertenecer a estas especies emergentes y multirresistentes.

Métodos. Se incluyeron 150 aislamientos clínicos de la colección de levaduras del Laboratorio de Micología Médica de la UPV/EHU obtenidos entre 1993 y 2017 que podrían haber sido identificados erróneamente por el método bioquímico API[®]ID 32C (bioMérieux, Francia). Como controles positivos se incluyeron tres aislamientos clínicos confirmados del Hospital La Fe de Valencia (dos de *C. auris* y uno de *C. duobushaemulonii*), así como la cepa de referencia *C. pseudohaemulonii* CBS10004. Todos los aislamientos se analiza-

ron mediante dos técnicas de PCR: una PCR específica de *C. auris* (Ruiz-Gaitán AC Int J Med Microbiol. 2018;308:812-818) y una PCR múltiple para identificar cuatro especies relacionadas con *C. haemulonii* (Arastehfar A Front Microbiol. 2018;29:9:1119). La identidad se confirmó mediante secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2. Finalmente, se analizó la sensibilidad *in vitro* a nueve agentes antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina y micafungina) usando Sensititre[™] YeastOne YO10 (Thermo Scientific, EE. UU.).

Resultados. La PCR específica de *C. auris* identificó correctamente los dos aislamientos confirmados de *C. auris* y no se detectaron bandas para los demás aislamientos analizados. Ocho aislamientos previamente identificados como *C. haemulonii* fueron confirmados mediante la PCR múltiple. Ningún aislamiento se identificó como *C. auris* o *C. pseudohaemulonii*. Un aislamiento obtenido de una uña del pie, previamente identificado en 1996 como *Candida intermedia* por el panel API[®]ID 32C, produjo una banda de 115 pb en la PCR múltiple, correspondiéndose con *C. duobushaemulonii*. Todas las identificaciones fueron confirmadas por secuenciación. Este aislamiento de *C. duobushaemulonii* fue identificado como *Candida sake* por el panel API[®]ID 32C actual. Además, fue sensible dosis-dependiente a itraconazol (CMI 0,5 µg/ml) y fluconazol (32 µg/ml). Todos los aislamientos de *C. haemulonii* también fueron sensibles dosis-dependiente a itraconazol (CMI 0,5 µg/ml) y fluconazol (16 µg/ml) excepto dos, que fueron resistentes (1 y 64 µg/ml, respectivamente), y su sensibilidad a la anfotericina B era reducida (2->8 µg/ml). *C. pseudohaemulonii* CBS10004 fue sen-

sible a todos los fármacos analizados. Ambos aislamientos de *C. auris* mostraron resistencia al fluconazol (CMI > 256 µg/ml), sensibilidad dosis-dependiente al itraconazol (0,25 µg/ml) y uno de ellos también era sensible dosis-dependiente a voriconazol (2 µg/ml).

Conclusiones. *C. haemulonii* y sus especies relacionadas pueden haberse asociado a candidiasis superficiales antes de su reciente

asociación con candidiasis invasoras, como indica la identificación de un aislamiento de *C. duobushaemulonii* anterior a 2012, cuando se estableció la clasificación actual. Estas especies muestran una sensibilidad reducida a los azoles y a la anfotericina B.