

Revista

IBEROAMERICANA

de

Micología

volumen

20

AEM



I Forum Micológico

Sección de Micología Médica

Asociación Española de Micología

Madrid, 13 de septiembre de 2003

Diagnóstico de las micosis invasoras y sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Coordinador:

Javier Pemán

IBERO
MYCO
JOURNAL



I Forum Micológico
Sección de Micología Médica
Asociación Española de Micología

Madrid, 13 de septiembre de 2003

Diagnóstico de las micosis invasoras y
sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Coordinador

Javier Pemán

Programa

- 9.00 h Aplicaciones de la Biología Molecular en el diagnóstico de las infecciones fúngicas
Dra. Francisca Colom
Universidad de Alicante, San Juan de Alicante, Alicante
- 10.00 h Presentación y discusión de las comunicaciones orales sobre Biología Molecular y Diagnóstico
- 11.00 h Pausa
- 11.30 h Utilidad de las técnicas serológicas en el diagnóstico de la aspergilosis invasora
Dr. Ramiro López Medrano
Hospital del Bierzo, Ponferrada, León
- 12.30 h Presentación y discusión de las comunicaciones orales sobre Diagnóstico Serológico
- 14.00 h Comida
- 16.00 h Aplicación de las curvas de letalidad en el estudio de la actividad *in vitro* de los antifúngicos
Dra. Mónica Romero
Hospital Universitario La Fe, Valencia
- 17.00 h Estudio de la actividad *in vitro* de las combinaciones de antifúngicos mediante técnicas de microdilución, Etest y curvas de letalidad
Dra. Emilia Cantón
Hospital Universitario La Fe, Valencia
- 18.00 h Presentación y discusión de las comunicaciones orales sobre Sensibilidad Antifúngica
- 19.00 h Clausura de la reunión científica
- 21.00 h Cena

PONENCIAS

Diagnóstico de micosis invasivas mediante técnicas de biología molecular

Consuelo Ferrer¹ y M^a Francisca Colom²

¹Instituto Oftalmológico de Alicante, Dpto de I+D+I, Laboratorio de Biología Molecular y ²División de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández

La Infección Fúngica Invasiva (IFI) es un proceso generalmente grave cuya incidencia está aumentando considerablemente por el incremento en el número de pacientes de riesgo para estas afecciones (trasplantados, inmunodeprimidos...). Las técnicas convencionales para detección e identificación de hongos, basadas fundamentalmente en el cultivo y observación microscópica, son en general lentas, lo que con frecuencia resulta en un considerable retraso en la instauración de una terapia específica adecuada. La demora en la instauración del tratamiento específico, sobre un enfermo ya de por sí debilitado, convierte a las IFI en procesos graves que a menudo suponen la causa de muerte del paciente. Estos hechos han llevado al desarrollo de métodos diagnósticos independientes del cultivo, que incluyen pruebas basadas en la detección de antígenos y anticuerpos, detección de productos metabólicos y detección e identificación de secuencias específicas del genoma mediante biología molecular. En cuanto a estas últimas, se han ensayado con éxito diversas técnicas, algunas de las cuales se vienen aplicando ya sobre un número considerable de muestras y, por tanto, comienzan a proponerse como posibles métodos de aplicación estándar.

Dianas genómicas: En la correcta orientación de un método diagnóstico basado en la detección de ácidos nucleicos, el primer paso es la adecuada selección de dianas. Estas pueden ser muy diferentes según se pretenda detectar una cepa, una especie o género concreto, o se dirijan a la detección inespecífica de cualquier tipo de hongo. Para cualquiera de los casos, las mejores dianas son las que aparecen con alto número de copias en el genoma, lo que confiere a las técnicas de detección, alta sensibilidad. Cuando el objetivo primero es detectar la presencia/ausencia de hongos, se eligen marcadores que estén presentes en todos los géneros fúngicos y preferiblemente secuencias de las que existan múltiples copias. Cuando se busca un género o especie concreta, la diana debe ser exclusiva del mismo y estar presente en un elevado número de copias en todos los individuos del grupo taxonómico que se pretende detectar. Hasta el momento, las dianas más importantes propuestas para detección de hongos pueden dividirse en dos grandes grupos: Las que se localizan en el complejo ribosomal (dianas ribosomales) y las No ribosomales.

Dianas No ribosomales: Las más conocidas y utilizadas corresponden a secuencias que codifican enzimas (gen de la actina y citocromo P450 en *Candida*), las que codifican telómeros del DNA mitocondrial y los métodos que utilizan amplificación por PCR mediante cebadores arbitrarios.

Dianas ribosomales: La región del genoma más utilizada como diana para amplificar y detectar DNA fúngico es la región del complejo ribosomal (genes 18S, 5.8S y 28S rDNA). Esta región es la más utilizada por dos razones fundamentales: La secuencia conservada de los genes ribosomales entre los hongos y su presencia en un elevado número de copias (unas 150 repeticiones en tándem de los genes rRNA en células de levaduras). Por otra parte, estos genes son buenos candidatos tanto como dianas universales como específicas, puesto que la unidad de transcripción presenta, entre las secuencias altamente conservadas (universales), regiones variables con secuencias específicas de especie. Entre los genes 18S y 5.8S, y entre las subunidades 5.8S y 28S del DNA ribosomal existen las regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2) que no se transcriben a rRNA. Estas regiones, al contrario que las correspondientes al rRNA, son distintas y divergentes, por lo que son excelentes dianas para la identificación de especies. Los primeros estudios utilizando el complejo ribosomal como diana, se concentraron en la subunidad 18S del rDNA. La comparación de secuencias dentro de esta región ha sido una herramienta útil para la identificación de géneros y especies. Sin embargo, la limitada variabilidad dentro de este rDNA, junto con la necesidad de comparar grandes secuencias, ha llevado a plantear un cambio hacia la utilización de la región más pequeña, comprendida entre el 18S rDNA y el 28S rDNA, como diana para separar especies fúngicas. Esta región incluye los espaciadores ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S rDNA. Hasta el momento, es la principal región analizada para detección e identificación de hongos, y la mayoría de los métodos moleculares se dirigen a ella. El fragmento completo tiene un tamaño de 600pb y las técnicas de diagnóstico pueden dirigirse tanto a la detección de la región completa (universal para hongos), como a secuencias específicas localizadas en los espaciadores, en las que pueden utilizarse varios métodos moleculares diferentes para la identificación del hongo (hibridación con sondas específicas; polimorfismo de tamaño; RFLP; SSCP, secuenciación directa del DNA amplificado).

Técnicas de detección: En cuanto a las técnicas de detección de dianas universales o específicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha desplazado a otros métodos basados en el estudio de los ácidos nucleicos, debido a su simplicidad, sensibilidad, rapidez y especificidad.

Ventajas y limitaciones: La principal ventaja del diagnóstico basado en biología molecular es, sin duda, la rapidez en la obtención de resultados. En tan sólo unas horas desde la toma de muestra, se puede establecer un diagnóstico fiable de micosis y, en pocas horas más, disponer de la identificación de la especie fúngica implicada. Por otra parte, es importante comentar, que el hecho de que el paciente esté bajo tratamiento antifúngico empírico, no entorpece la obtención de resultados ya que se detectan tanto elementos viables como no viables. Per estos métodos no están libres de limitaciones que es necesario tener en cuenta. La contaminación de las muestras por hongos de ambiente es una limitación grave, especialmente de la PCR, con la que pueden obtenerse falsos positivos por magnificar una presencia fúngica mínima. El problema es más importante cuando las dianas son secuencias universales, por lo que el manejo en condiciones de esterilidad y la utilización sistemática de controles negativos se hace imprescindible. Las muestras de tejidos primariamente estériles, como suelen ser los sometidos a estudio en micosis invasivas, presentan obviamente mucho menor problema que las correspondientes a muestras sospechosas de micosis superficiales. Hay que añadir además, que para la PCR, la presencia de inhibidores de la polimerasa en el material a estudiar, es otro de los posibles inconvenientes del método. Hasta el momento, la técnica ha sido ensayada en diversos tejidos y los protocolos de tratamiento de las muestras parecen no presentar problemas en este sentido, no obstante, es necesario realizar controles positivos con muestras similares para trabajar en un rango de confianza aceptable.

Conclusión: La aplicación de los métodos rápidos de detección y análisis de secuencias genómicas universales y específicas de hongos, para el diagnóstico rápido de micosis invasivas, supone disponer de una herramienta de extraordinaria utilidad en el manejo de enfermos críticos. La amplificación por PCR de las secuencias que codifican para las subunidad 5.8S del rRNA y los espaciadores que la flanquean, se ha revelado como un método de extraordinaria efectividad en la detección de hongos en cualquier tipo de muestra, a la vez que permite la posibilidad de realizar una identificación rápida el agente causal, en la mayoría de los casos a nivel de especie. No obstante, es imprescindible hacer una cuidadosa reflexión sobre el desarrollo y aplicación de los métodos moleculares disponibles, y ampliar los estudios que aplican en paralelo estas técnicas y las de micología tradicional, como único camino válido para establecer protocolos seguros de trabajo en la práctica clínica diaria.

Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. J Infect Dis 1993 Sep;168(3):779-783

Dammann R, Lucchini R, Koller T, Sogo JM. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. Mol Cell Biol 1995 Oct;15(10):5294-5303.

Perspectivas en el diagnóstico serológico de la aspergilosis invasiva

Ramiro López Medrano

Sección de Microbiología, Hospital El Bierzo, Ponferrada, León

En los últimos tiempos la aspergilosis invasiva (AI) es sin duda el centro de atención dentro del universo de las aspergilosis. Son el resultado de complejas interacciones aun no del todo desveladas entre un hongo patógeno oportunista y un huésped cuya capacidad de respuesta se ha ido modificando artificialmente a consecuencia de los últimos avances médicos. En la última década numerosos trabajos en este campo han arrojado gran cantidad de información sobre el tema, aun no suficientemente contrastada, generando nuevas expectativas para el clínico. En la década de los 90 se realizaron importantes progresos en la estandarización de los procedimientos de extracción de antígenos para el serodiagnóstico y en la caracterización de antígenos clave de *Aspergillus fumigatus*. Con la ayuda de técnicas de biología molecular se pusieron a punto nuevos métodos de estudio de la virulencia, como los experimentos de disrupción génica y se diseñaron modelos animales de aspergilosis invasiva. Se secuenciaron los primeros genes de proteínas y antígenos de *Aspergillus fumigatus* y se construyeron las primeras genotecas de DNA, antes sólo posibles en su pariente *Aspergillus nidulans*, más sencillo de estudiar. También se avanzó en el estudio del funcionamiento de los neutrófilos y macrófagos en respuesta a la infección y en el papel de la inmunidad celular. Pero el verdadero motor de toda esta investigación sigue siendo el diagnóstico de la AI. Su incremento en las últimas décadas, su gravedad y su rápida evolución han captado la atención de los investigadores, que han tratado de encontrar un sistema de diagnóstico serológico rápido y seguro que permita encauzar un tratamiento antifúngico capaz de mejorar la supervivencia de los enfermos.

El enfoque del serodiagnóstico comenzó estudiando la respuesta humoral: pronto se vio que lo habitual es que no se detecten anticuerpos específicos, en las AI debido a la inmunodepresión de los grupos de riesgo. Esto es especialmente cierto cuando se emplean las técnicas de inmunodifusión, que son las de mayor implantación en los laboratorios y que

además son poco sensibles. Sin embargo pueden detectarse anticuerpos por técnicas más sensibles como el *immunoblotting*. Esto sucede en las AI con menor grado de inmunodepresión y puede estar relacionado con un mejor pronóstico. Sin embargo el significado exacto de estos anticuerpos continúa sin conocerse: se precisan estudios que delimiten con claridad su posible valor pronóstico así como su comportamiento durante el tratamiento antifúngico.

En las AI el hecho es que *Aspergillus fumigatus* acaba invadiendo órganos y tejidos haciendo que parte de la estructura de las hifas, de sus metabolitos o de sus toxinas estén presentes en las muestras clínicas. Por ello la detección de antigenemia se ha convertido en el abordaje principal del serodiagnóstico y en el punto que acapara mayor interés. Numerosos productos de *Aspergillus* se han detectado en muestras de pacientes con AI: metabolitos (D-manitol), toxinas (ribotoxina de 18 kDa), elementos estructurales de la pared celular de las hifas (diversas glicoproteínas, beta 1,3-glucano), proteínas citosólicas, ácidos nucleicos y diversos productos excretados como el galactomanano entre otros. La mayoría de ellos se han ido describiendo desde principios de los años 90 en trabajos de investigación pero carecen de aplicación clínica inmediata. Sólo la detección del galactomanano (GM) está comercialmente disponible y es de amplio uso en los laboratorios. Se basa en la detección de GM en suero pero también en orina, BAL, etc. Existen dos sistemas de detección basados en el empleo del mismo anticuerpo monoclonal EB-A2, dirigido frente a las cadenas laterales del galactomanano: la aglutinación en látex (*Pastorex-Aspergillus*) y el ELISA doble sandwich (*Platelia-Aspergillus*). Es importante recordar que el galactomanano es la porción azucarada de muchas glicoproteínas secretadas por *Aspergillus* y está compuesto por un core central no inmunogénico del que parten cortas cadenas laterales de galactosa que sí son inmunogénicas. Los primeros estudios de aglutinación en látex datan de finales de los 80 y pronto se observa que la positividad del antígeno se alcanza en etapas muy avanzadas de la enfermedad, con frecuencia fuera de tiempo para instaurar un tratamiento antifúngico exitoso. La técnica detecta a partir de 15 nanogramos de GM por mililitro de suero. Por ello a lo largo de la siguiente década los esfuerzos se dirigen a mejorar la sensibilidad de la técnica empleando un ELISA doble sandwich basado en el mismo anticuerpo monoclonal EB-A2 capaz de detectar tan sólo 1 nanogramo por mililitro de GM. En los primeros estudios de grandes series, realizados mayoritariamente en trasplantes medulares, los resultados de sensibilidad y especificidad resultaron ser muy altos (95% para cada una). Además se informó de la detección de GM en suero una o dos semanas antes del inicio de los síntomas, lo que permitiría instaurar una terapia antifúngica cuya eficacia podía además monitorizarse por la misma técnica. Tras la redefinición de los criterios de clasificación de las AI por organismos como la EORTC los mismos autores en trabajos posteriores siguieron comunicando una altísima sensibilidad (100%) con una especificidad algo inferior (96%) y un valor predictivo positivo de sólo el 68%. En esta ocasión el número de falsos positivos obligó a considerar la prueba positiva sólo cuando se detecta GM en dos muestras de suero consecutivas. En la literatura posterior los resultados de sensibilidad y especificidad varían considerablemente, comunicando sensibilidades tan bajas como el 50% en recientes trabajos. Se han ido describiendo además numerosos falsos positivos en niños sometidos a trasplante medular no infectados, en prematuros y los causados por la inclusión de cereales en la dieta, entre otros. Con frecuencia se informa de resultados discordantes y contradictorios. En cualquier caso parece que estos problemas de inespecificidad derivan de que el sistema de detección es demasiado sensible y emplea un anticuerpo monoclonal que detecta restos azucarados del GM comunes a muchas especies de hongos, contaminantes habituales del laboratorio. Ello obliga a repetir las determinaciones, lo que encarece y alarga la obtención de resultados clínicamente útiles. Además la mayoría de las evaluaciones realizadas se han hecho en un sólo grupo de riesgo, que es el de los trasplantes medulares. Por ello se precisan estudios rigurosos que permitan establecer la utilidad real de la técnica en éste y otros grupos de riesgo, asegurar la precocidad del diagnóstico y demostrar su utilidad en la monitorización del tratamiento antifúngico. Otros sistemas de detección de antigenemia se basan en la detección de beta 1,3 glucano, componente de la pared celular de los hongos, en plasma de pacientes con AI. Aunque con buena sensibilidad (90%), es inespecífico para *Aspergillus* ya que se detecta en plasma en otras micosis invasivas como candidiasis o criptococosis, lo que limita su utilidad. El enfoque más prometedor parte de la detección de ácidos nucleicos (ADN sobre todo) de *Aspergillus fumigatus* en muestras clínicas diversas. Actualmente se está en discusión sobre problemas técnicos que permanecen sin dilucidar: la muestra más adecuada, el método de extracción de ADN más eficaz, la técnica de amplificación idénea y la región a amplificar. Los primeros trabajos sobre PCR apuntan al suero como una buena muestra para PCR en ventaja sobre otras como el BAL, aunque la sangre total parece un tipo de muestra prometedor. La literatura parece indicar que estas técnicas son muy sensibles (aunque menos que la detección del GM) y no están exentas de falsos positivos. Las técnicas basadas en PCR que permiten la cuantificación del ADN podrían solventar algunos de estos problemas.

En el momento actual continúa la búsqueda de un sistema de detección de antigenemia, que inevitablemente pasa por: A/ Estudios rigurosos de evaluación del ELISA para detección de GM ampliados a todos los gru-

pos de riesgo. B/ Estudios comparativos entre técnicas de detección (GM versus PCR): ¿cuál de ellas refleja mejor la masa fúngica infectante?. C/ Determinar si el empleo de estas técnicas en AI ayuda a conocer el momento de la infección y a diferenciar colonización de infección. D/ Establecer marcadores de infección y seguimiento en paralelo con la respuesta inmune. E/ Combinación con otros procedimientos diagnósticos como el TAC o la detección de pacientes susceptibles por técnicas de estudio de la inmunidad celular.

Aplicación de las curvas de letalidad en el estudio de la actividad *in vitro* de los antifúngicos

M. Romero, E. Cantón

El método de las curvas de letalidad o mortalidad-tiempo, ampliamente utilizado en bacterias, proporciona información importante sobre la dinámica de la acción microbicida de un antimicrobiano y sobre la relación entre concentración y actividad microbicida. Esta técnica es útil para la investigación de nuevas sustancias, la determinación del sinergismo y antagonismo entre diferentes antifúngicos y la mejor comprensión de su mecanismo de acción. Consiste en inocular una serie de tubos que contienen concentraciones conocidas de antifúngico, con una concentración también conocida de levaduras. A determinados tiempos se toma una muestra de la solución que, diluida convenientemente, se siembra en placas de agar glucosado de Sabouraud. Tras incubarlas durante 24-48 horas se cuenta el número de colonias por placa (UFC), expresando los resultados en UFC/ml o como porcentaje de células supervivientes con respecto al inóculo inicial. Estos cálculos se trasladan a una gráfica semilogarítmica que nos permite determinar la actividad fungicida o fungistática y una serie de parámetros como son el tiempo de inicio de la actividad, la mínima concentración con efecto fungicida, el tiempo en el que se produce este efecto y el tiempo en el que se produce una reducción de 3 log respecto al inóculo, la duración de la fase de latencia, el número de colonias viables a las 24-48 horas de incubación y la velocidad de crecimiento o muerte para cada concentración.

El cálculo de la curva se realiza aplicando una función matemática que se ajuste a los datos obtenidos. En general los antifúngicos siguen una cinética monoexponencial de primer orden en la que la letalidad aumenta con el tiempo. Pero también puede darse una cinética biexponencial con dos velocidades de letalidad, o sigmoidea con una fase de latencia antes de empezar la letalidad, seguida de una fase rápida y otra fase en la que la velocidad es constante o no aumenta significativamente.

La tasa de letalidad o crecimiento viene determinado por una constante K que depende de diversos factores, permitiendo la comparación del efecto de los mismos en la cinética de la acción fungicida. La aplicación de un análisis de varianza, permite además determinar a partir de que concentración hay un aumento de letalidad, y entre que concentraciones hay diferencias significativas de letalidad.

Para realizar estos estudios, debemos conocer previamente una serie de parámetros como son: la CMI del microorganismo en el medio que vamos a utilizar, las concentraciones a ensayar, la dinámica de crecimiento de la levadura, el efecto del antifúngico arrastrado con la muestra y el inóculo de partida.

Por otro lado existen también una serie de factores que influyen en la actividad fungicida como la temperatura y las condiciones de incubación, el pH y el tampón, el medio de cultivo, el microorganismo, el inóculo, la fase de crecimiento y el antifúngico ensayado.

Aunque este método no está todavía estandarizado, en esta ponencia se expondrán las condiciones bajo las cuales se suelen llevar a cabo estos ensayos y algunos ejemplos de curvas de letalidad obtenidas para diferentes antifúngicos y especies de levaduras así como los resultados y conclusiones obtenidos.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller M. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1207-1212.

Cantón E, Pemán J. Curvas de letalidad en antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 82-85.

Estudio de la actividad *in vitro* de las combinaciones de antifúngicos mediante técnicas de microdilución, Etest y curvas de letalidad

M. Romero, E. Cantón

Resumen no disponible

COMUNICACIONES

Aplicación de la Biología Molecular al Diagnóstico de Infección Fúngica Invasiva. Primeros Resultados

Alejandro Jover^{1,2}, Alfredo Zorraquino³, M^a Francisca Colom³, Jorge L. Alió^{1,2} y Consuelo Ferrer¹

¹Instituto Oftalmológico de Alicante; ²Universidad Miguel Hernández, Alicante; ³Hospital Universitario de San Juan, Alicante

OBJETIVO. Diagnóstico de Infección Fúngica Invasiva mediante amplificación por PCR de dianas ribosomales en muestras de pacientes de dos centros clínicos de Alicante.

INTRODUCCIÓN. El diagnóstico microbiológico de infecciones fúngicas invasivas (IFI) se realiza en muchos casos mediante cultivo. Este proceso puede durar tiempos superiores a una semana, con el consiguiente riesgo para la salud del paciente. El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular como la PCR, permite obtener en menos de 24 horas, información sobre del tipo de microorganismo que causa la infección, permitiendo instaurar un tratamiento eficaz temprano (antifúngicos o antibacterianos).

MATERIALES Y MÉTODOS. Se incluyen en el estudio 77 muestras procedentes del servicio de microbiología del hospital de San Juan y del Instituto oftalmológico de Alicante. Los tipos de muestras procesadas fueron: Líquido de Lavado Broncoalveolar (LBA), líquido pleural (LP), líquido sinovial, raspado corneal (RC), humor acuoso (HA), humor vítreo (HV) y líquido ascítico (LA).

Las muestras se procesaron en paralelo mediante cultivo en agar de Sabouraud cloranfenicol y extracción de DNA para diagnóstico molecular. Este último se realizó mediante amplificación por PCR de la secuencia ribosomal que corresponde a la subunidad 5.8S y los espaciadores que la flanquean. Para aumentar la sensibilidad del método se realizó una segunda amplificación, (semi nested PCR) con un nuevo cebador que híbrida con una zona conservada del 5.8S rDNA, manteniendo el cebador que híbrida con el extremo 5' del 28S rDNA. Este método permite detectar la presencia de hongos de forma inespecífica. Para la identificación, se secuenciaron los productos amplificados y las secuencias se compararon con las bases de datos del EMBL y NCBI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Del total de las muestras estudiadas, sólo 8 fueron positivas por cultivo (10%), en cambio 21 fueron positivas por PCR (27%), 5 de ellas en la segunda amplificación. Sólo uno de los positivos por cultivo fue negativo por PCR, probablemente por una contaminación de la muestra (LBA) o del cultivo. La comparación de resultados de ambas técnicas (PCR/cultivo) para cada tipo de muestra fue: LP 2/0; LBA 7/3; LA 4/0; RC 5/4; HA y HV 2/1. En general, y para todos los tipos de muestra, la PCR resultó ser más sensible que el cultivo.

Consultadas las historias clínicas de cada uno de los pacientes existió concordancia con los resultados obtenidos por biología molecular, excepto para las cuatro muestras de LBA positivas por PCR y negativas por cultivo. La PCR parece ser una herramienta demasiado sensible para muestras no estériles como LBA o cepillados bronquiales.

Las especies identificadas fueron las siguientes: *Fusarium oxysporum* (1), *Alternaria sp.* (1), *Alternaria alternata* (2), *Aspergillus flavus* (1), *Candida albicans* (6), *Penicillium chrysogenum* (1), *Alternaria infectoria* (1), *Cryptococcus magnus* (1).

Criptococosis en España: Epidemiología molecular

Susana Frasés¹, Consuelo Ferrer², Manuel Sánchez¹, M^a Francisca Colom¹

¹División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Alicante e

²Instituto Oftalmológico de Alicante

La criptococosis es una enfermedad fúngica, grave y generalmente oportunista, que suele afectar a pacientes con deterioro en el sistema inmunológico. De hecho la prevalencia de criptococosis en una población puede considerarse un "centinela" o marcador del porcentaje de individuos con alteraciones inmunitarias. La aparición y difusión del SIDA ha sido por tanto un fenómeno clave en el protagonismo de este microorganismo en el panorama de la patología infecciosa y ha supuesto que los conocimientos sobre el mismo se ampliaran extraordinariamente y nos llevaran a descubrir un patógeno muy distinto a la mayoría de los descritos y del que quedan todavía numerosos aspectos por aclarar. En este sentido, la diferente ecología, distribución geográfica, epidemiología y virulencia de sus dos variedades (*C.n. var. neoformans* y *C.n. var. gattii*) ha supuesto un interesante estímulo para el estudio de numerosos aspectos fisiológicos y moleculares de esta levadura. Son numerosos los trabajos en los que se intenta relacionar el fenotipo y comportamiento de *C. neoformans* con rasgos del genotipo. Los numerosos trabajos llevados a cabo para la obtención de patrones cromosómicos de *Cryptococcus neoformans*, muestran una elevadísima variabilidad de cariotipo tanto en cepas de

medio ambiente como clínicas. Los estudios que buscan el tipado molecular de los serotipos y variedades de *Cryptococcus*, se han intentado interpretar desde un punto de vista epidemiológico buscando patrones que muestren una determinada relación con la procedencia de los aislados. Los marcadores moleculares propuestos hasta el momento incluyen elementos repetidos del genoma (los denominados secuencias minisatélites), el patrón de digestión de determinados genes, la secuencia de los espaciadores intergénicos situados entre genes del rDNA y otros. Algunos de los marcadores propuestos han llegado a establecer una determinada distribución de patrones según áreas geográficas, pero los resultados no son todavía concluyentes y es de gran interés ampliar la muestra epidemiológica para valorar la efectividad de la herramienta molecular ensayada.

Hasta el momento se han recogido más de 50 de muestras de medio ambiente y 65 aislados de muestras clínicas de los que se dispone de abundante información epidemiológica, clínica y micológica. Sobre esta base se han ensayado distintos marcadores moleculares que incluyen CNRE1, Huella digital (DNA fingerprinting) de secuencias minisatélite (GACA)_n y de genes de las subunidades 5S y 5.8S del rDNA y de sus espaciadores (ITS); digestión de las subunidades del rDNA y del gen URA5.

Los resultados de tipado molecular no muestran variaciones determinantes en cuanto a la distribución por áreas geográficas de los diferentes aislados aunque es de destacar, que en la obtención del patrón de digestión del gen URA5, se observan los mismos patrones que en trabajos previos realizados en otras zonas del mundo diferenciándose 8 patrones moleculares de clara utilidad epidemiológica, lo que no ha sucedido al ensayar otros marcadores como la amplificación de secuencias minisatélites (GACA)_n, aunque algunos autores proponen esta técnica para genotipado de la levadura, planteando una correlación estable con los serotipos, la diversidad es demasiado elevada y, por tanto, la correlación con serotipo compleja y, hasta ahora, difícilmente reproducible.

Los genes del rDNA, son actualmente una de las dianas más estudiadas en el genoma de los hongos, fundamentalmente para detección e identificación de especies mediante biología molecular. La estabilidad de la secuencia de los genes ribosomales dentro del reino de los hongos, unida a la especificidad de la de sus espaciadores internos (ITS), supone una herramienta de gran utilidad en diagnóstico rápido de micosis. La amplificación de las subunidades 18S y 5.8S del rDNA y posterior digestión enzimática, distingue especies de forma rápida y clara y, en nuestro estudio, permite distinguir a *C. neoformans* de *T. beigeli*, lo que es de relevancia diagnóstica debido a los falsos positivos que estas dos especies generan por compartir antígenos y otras características empleadas en pruebas clásicas de identificación.

En cuanto a la obtención de patrones de restricción de la subunidad 5S del rDNA, la diversidad de resultados es muy elevada, no encontrándose correlación entre patrones y serotipos, factor de riesgo, etc.; Nuestros resultados muestran patrones diferentes para distintas cepas y coincidentes en casos de aislados de recidivas de criptococosis en un mismo paciente, lo que puede tener una interesante aplicación en el seguimiento de enfermos de criptococosis que con frecuencia recidivan, aunque existen también aislamientos muy alejados que comparten el patrón de bandas. La sensibilidad del método podría mejorarse con doble digestión, para cortar el fragmento en las cepas que poseen un amplificado de 850-950 pb, en que *CfoI* no corta la secuencia.

Uno de los resultados más relevantes del estudio, son los patrones obtenidos tras la digestión del gen URA5 que muestran una interesante correlación con el factor de riesgo en enfermos de criptococosis. Los aislados de pacientes VIH positivos presentan dos tipos de patrones (VNI y VNII), y los procedentes de otros pacientes, muestran 6 patrones diferentes y distintos a estos. Estos resultados coinciden con los encontrados en el estudio de epidemiología realizado con cepas latinoamericanas.

Infección mixta por los serotipos A y B de *Cryptococcus neoformans* como causa de meningoencefalitis en una niña de Pará, Brasil: historia del caso

Luciana Trilles¹, Liline M. S. Martins², Márcia S. Lazéra¹, Maria José S. Leal², Maria do Amparo S. Cavalcanti², Kelsen D. Eulálio², Bodo Wanke¹

¹Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FioCruz, Rio de Janeiro e ²Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, Faculdade de Ciências Médicas do Piauí, Brasil

Introducción: *Cryptococcus neoformans* es un hongo cosmopolita, frecuentemente asociado a enfermos de SIDA, causante de meningoencefalitis grave, aunque rara en niños. En Brasil, la infección se produce principalmente en el N y el NE en forma endémica afectando a individuos inmunocompetentes o bien asociada a factores de riesgo. Se describe un caso clínico que aporta aspectos epidemiológicos poco conocidos.

Historia clínica. Datos personales: Paciente femenina de 9 años de edad, estudiante, residente en Itaituba-Pará, internada en el Hospital Infantil Lucídio Portela del estado de Piauí. **Antecedentes clínicos:** Cuadro de 9 meses de evolución, con diagnóstico de hepatitis crónica, malaria y neuropatía bilateral, presentando también crisis convulsivas, dolor abdomi-

nal, y fiebre vespertina acompañada de escalofríos y epistaxis. **Historia actual:** En el momento del ingreso paciente de 29 kg de peso, hidratada, no cianótica, asténica, taquipneica y taquicárdica. La enferma presentaba ictericia, palidez, colúria, heces acólicas, sialorrea, epistaxis, cefalea, y obnubilación. Se inició tratamiento con diuréticos, antibioterapia antibacteriana IM y IV, antihelmínticos y antiinflamatorios. Se practicó punción lumbar detectándose en LCR una levadura capsulada compatible con *C. neoformans*. Se administró anfotericina B, asociada posteriormente a fluconazol (150 mg/día). La paciente evolucionó hacia un cuadro de hidrocefalia comunicante con síntomas de hipertensión intracraneal, siendo sometida a derivación ventricular externa a pesar de la cual se instauró clínica de distensión abdominal, disnea, crisis convulsivas, hemorragia digestiva y coma con resultado fatal. **Resultados de laboratorio:** LCR de aspecto límpido, 44 células/mm³, glucosa 11 mg/dl y proteínas 42.6 mg/dl. La resiembra en medio NSA dio lugar al crecimiento de colonias fenol-oxidasa positivas de color pardo claro y pardo oscuro, correspondientes a fenotipos distintos en cuanto a la producción de melanina. Del crecimiento obtenido se identificaron 10 colonias, de las cuales 6 pertenecían a *C. neoformans* serotipo A canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) negativo; las 4 colonias restantes correspondían a *C. neoformans* serotipo B CGB positivo. **Comentarios:** Se trata del primer caso descrito de meningoencefalitis criptocócica mortal producida por dos serotipos del hongo en una niña VIH-negativa, originaria de Pará. En este estado, al igual que en Amazonas y Piauí, se han diagnosticado cuadros clínicos de criptococosis en niños no relacionadas con SIDA. En Roraima y en Piauí ya ha sido descrita la colonización de árboles tropicales por los serotipos A y B, pudiendo representar fuentes ambientales de infección para el hombre. Hasta el momento actual no se han realizado estudios de esta naturaleza en Pará. Llamamos la atención, dada su gravedad, acerca de la necesidad del diagnóstico precoz de la criptococosis como causa de neumonía y meningitis en la Amazonia y en la región "Meio-Norte" de Brasil, áreas con características propias y de eco-epidemiología distinta a la descrita para la criptococosis en otras regiones del mundo.

Tipificación molecular de hongos aislados de muestras clínicas y su relación con el ambiente hospitalario

C. Durán¹, M.E. García¹, M. Cruzado¹, M. Andrino¹, T. Peláez², P. Muñoz², E. Bouza², J.L. Blanco¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid y ²Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid

La rápida identificación de patógenos en muestras clínicas es esencial para el posterior tratamiento de la infección fúngica. Aunque existen métodos de diagnóstico de hongos prácticamente inmediato como la detección de ADN por PCR a tiempo real, es necesaria una técnica que permita diferenciar las cepas presentes en los pacientes de las ambientales cuando se sospecha de una infección nosocomial. El objetivo en estos casos es la tipificación genotípica de las cepas aisladas; para ello el método más absoluto es la secuenciación pero se necesita un método rápido de identificación de cepas que permita estudiar las posibles correlaciones entre los aislados de las muestras clínicas y los aislados ambientales.

La técnica empleada en nuestro laboratorio es la amplificación al azar del material genético por medio de RAPDs (Random Amplified Polymorphisms DNA markers) utilizando distintos cebadores. Los RAPDs se realizaron con cuatro cebadores distintos: NS3 (5' GCA-AGTCTGGTGCCAG 3', C5 (5' AACGCGCAAC 3') y R108 (5' GTATTGCCCT 3') para las cepas de *Aspergillus fumigatus*. En el caso de la levadura *Trichosporon beigeli* se añadió otro cebador al estudio, el llamado OPA13 (5' CAGCACCCA 3').

Después de comparar los patrones de amplificación obtenidos se eligieron para la tipificación de cepas de *A. fumigatus* los cebadores C5 y R108. Los resultados fueron reproducibles y en ambos casos se obtuvieron diferencias en los patrones de bandas de las cepas estudiadas. Las amplificaciones realizadas con el cebador NS3 mostraban patrones de amplificación idénticos para todas las cepas por lo que este cebador se eliminó del estudio. En el caso de *T. beigeli* se obtuvieron patrones de amplificación útiles para la tipificación con los cebadores R108 y OPA13. Los resultados en las cepas de levadura con NS3 y C5 se descartaron porque no eran discriminarios.

Esta metodología ha sido aplicada con éxito para tipificar cepas de *A. fumigatus* procedentes del ambiente y de pacientes con aspergilosis invasivas. La metodología permite comprobar por comparación de los patrones de amplificación si la cepa infectiva es la misma que la ambiental. En el caso de *Trichosporon* se ha podido diferenciar entre dos brotes infectivos en pacientes neonatos separados temporalmente. La tipificación molecular de las cepas aisladas de ambos brotes concluyeron que las infecciones fueron producidas por dos cepas distintas, eliminando así la posibilidad de la permanencia en el ambiente de la primera cepa infectiva.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Salud 00/0016-02.

Utilidad diagnóstica de la nueva técnica *Candida albicans* IFA IgG en la candidiasis invasora

María Dolores Moragues¹, Natalia Ortiz², Pilar A. Ezkurra², José Ramón Iruretagoyena², Juan Carlos García-Ruiz⁴, Elena Amutio⁴, Almudena Rojas⁵, Joaquín Mendoza⁵, Guillermo Quindós² y José Pontón²
¹Departamento de Enfermería I y Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología², Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Apartado 699, 48080 Bilbao, Vizcaya; ³Unidad de Cuidados Intensivos³ y Servicio de Hematología⁴, Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n. 48903 Baracaldo, Vizcaya y Laboratorios Vircell SL⁵, Plaza Domínguez Ortiz 1, Polígono Industrial Dos de Octubre, Santa Fé, 18320 Granada

Introducción: El aumento de las candidiasis invasoras en pacientes inmunodeficientes y/o sometidos a cirugía extensa, junto con la dificultad de su diagnóstico clínico están estimulando la búsqueda de nuevas herramientas que mejoren y faciliten el diagnóstico temprano de estas infecciones graves. En este estudio, hemos comparado la utilidad diagnóstica de dos pruebas de detección de anticuerpos anti-micelio de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis invasora: una nueva técnica recién comercializada (*Candida albicans* IFA IgG, Vircell S.L.) y la técnica tradicional de detección por inmunofluorescencia indirecta.

Pacientes y métodos: Se emplearon dos técnicas de inmunofluorescencia indirecta para estudiar de forma retrospectiva un total de 172 sueros pertenecientes a 51 pacientes hospitalarios clasificados en dos grupos:

a) El grupo I incluía 123 sueros de 32 pacientes, ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos o en el Servicio de Hematología, con candidiasis invasora.

b) El grupo II, utilizado como control, comprendía 49 sueros de 19 pacientes ingresados en los mismos servicios pero sin evidencia de infección por *Candida*.

Resultados: Si empleábamos como indicador diagnóstico de candidiasis invasora un título de corte para los anticuerpos anti-micelio en suero

1:160, la prueba *Candida albicans* IFA IgG presentó una sensibilidad del 84,4 % y una especificidad del 94,7 %, mientras que la técnica tradicional presentó una sensibilidad del 78,1 % y una especificidad del 100%. Bajo este criterio, el 84,4% de los pacientes con candidiasis invasora (grupo I) presentó títulos de anticuerpos anti-micelio 1:160 con la prueba *Candida albicans* IFA IgG, mientras que el 78,1 % lo hicieron con la técnica tradicional. Cuando se compararon los títulos máximos obtenidos por paciente, ambas técnicas presentaron una elevada correlación lineal ($R^2 = 0,9512$). El valor de R^2 fue 0,8986 cuando se realizó la comparación entre los valores obtenidos para todos los sueros estudiados por las dos técnicas.

Conclusión: La prueba comercializada *Candida albicans* IFA IgG ofrece resultados comparables a los conseguidos con la prueba tradicional empleada para la detección de anticuerpos anti-micelio, aunque tiene como ventajas que permite un diagnóstico más rápido y sencillo de la candidiasis invasora en los servicios hospitalarios de Microbiología clínica.

Fallo para realizar diagnóstico precoz de aspergilosis invasora en pacientes inmunodeprimidos no neutropénicos, utilizando como método microbiológico indirecto la detección de antígeno de galactomanano en suero

Carmen Pazos y Amalia del Palacio
¹Servicio de Microbiología, Sección de Micología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. E-mail: pazos.c@terra.es

OBJETIVO: Exponer que la detección de antígeno de galactomanano en suero como método de diagnóstico indirecto de Aspergilosis Invasora (AI), presenta fallos de sensibilidad y precocidad, en aquellas poblaciones inmunosuprimidas no neutropénicas, que impide realizar un diagnóstico precoz de dicha enfermedad y de ello se deriva la falta de instauración de terapia anticipada antifúngica que aumentaría la supervivencia del paciente.

Partimos del conocimiento de que pacientes con enfermedad hematológica de base junto a neutropenia intensa y mantenida en el tiempo, representa el grupo poblacional de mayor riesgo para el desarrollo de AI, y en donde parece de utilidad, por los numerosos estudios realizados y publicados, la detección de galactomanano en suero como herramienta de diagnóstico precoz de dicha infección fúngica invasiva.

MATERIAL Y MÉTODOS: Revisamos las historias clínicas de dos pacientes pertenecientes a poblaciones diferentes a la hematológica neutropénica para valorar los diferentes factores de riesgo e intentar alcanzar un diagnóstico precoz de AI utilizando diferentes procedimientos microbiológicos tradicionales (visión directa y cultivo), examen histopatológico de los tejidos implicados, técnicas radiológicas (Rx, TC), signos y síntomas clínicos, sin olvidarnos de las últimas novedades de diagnóstico microbiológico rápido mediante la determinación de la respuesta de los antígenos fúngicos (detección de galactomanano de la pared fúngica gracias a un ELISA de doble sándwich [Platelia Aspergillus, Bio-Rad] con límites de detección de 1 ng/ml de suero).

RESULTADOS:

- Paciente nº 1: varón de 41 años de edad que presenta como factor de riesgo ser VIH positivo en estadio C3, pero refiere realizar de forma correcta tratamiento antirretroviral y no presenta analíticamente datos de enfermedad avanzada (405 linfocitos CD4 y carga viral indetectable). En ingreso previo ha tenido episodio de fiebre de origen desconocido, con cultivo de esputo en donde se aísla *Aspergillus fumigatus* y radiología compatible con neumotórax loculado y engrosamiento pleural izquierdo, motivo por el cual se pauta de forma ambulatoria antibióticos de amplio espectro, corticoides e itraconazol en espera de biopsia pulmonar.

Actualmente refiere clínica de fiebre, tos, hemoptisis y disnea. Radiológicamente se observa lesión tabicada y nivel hidroaéreo en LSI, por lo que se coloca tubo de drenaje y el líquido pleural herrumbroso que se extrae se envía a microbiología, donde se aísla *Aspergillus fumigatus* y en donde el galactomanano es positivo (2.564 ng/ml). Asimismo se extrae suero al paciente y en dicha muestra el galactomanano permanece invariablemente negativo (<1.5 ng/ml) incluso cuando diluimos los sueros pensando que el exceso de anticuerpos antigalactomanano podría derivar en resultados falsos negativos por la formación de complejos inmunes.

Por dicho motivo realizamos la determinación de anticuerpos específicos anti- *Aspergillus* mediante inmunoprecipitación utilizando antígeno metabólico y somático liofilizado de *Aspergillus fumigatus* (Bio-Rad), obteniéndose valores elevados de precipitinas en suero.

-Paciente nº 2: mujer de 55 años de edad que presenta como factores de riesgo, el ser receptora de trasplante de riñón-páncreas hace 8 meses. Asimismo mantiene tratamiento inmunosupresor selectivo con tacrolimus, micofenolato mofetilo, así como prednisona (15 mg/día).

Ingresó por deterioro de la función renal, en el contexto de rechazo agudo de injerto renal, tratado con choques de metilprednisolona con control parcial. Posteriormente desarrolla uropatía obstructiva que obliga a nefrostomía y catéter intero-externo sin resultados. Comienza con dolor en FII, se realiza biopsia renal donde se objetiva rechazo intersticial que conlleva a nefrectomía del injerto renal y colocación de catéter yugular izquierdo para hemodiálisis. Se extraen sueros y el galactomanano permanece negativo.

Reaparece el dolor en hipocondrio izquierdo y en el TAC abdominal se observa líquido libre, con aumento de densidad del tejido subcutáneo y burbujas.

Se añade tos, disnea y febrícula, con radiología de tórax normal. Se pauta tratamiento antibiótico de amplio espectro y oxigenoterapia. Aumenta la insuficiencia respiratoria e ingresa en UCI para intubación orotraqueal. En radiología de tórax se aprecia atelectasia del LSD y se realiza fibrobroncoscopia para resolverla, tomándose cultivo y biopsia ante las lesiones sugerentes de *Aspergillus* spp. e iniciándose tratamiento antifúngico. Se vuelve a determinar los niveles de galactomanano en suero y se obtienen índices de densidad óptica de 5.122 ng/ml que en días posteriores ascienden hasta 9.0 ng/ml.

CONCLUSIONES: Resaltamos que en pacientes inmunosuprimidos no neutropénicos, como pueden ser los que aquí exponemos (SIDA y trasplante de órgano sólido), la detección de galactomanano en suero como método de diagnóstico precoz, no es una herramienta que resulte eficaz, tal como ocurre en pacientes con neoplasias hematológicas de base o trasplantados de médula ósea, donde numerosos estudios prospectivos avalan su utilidad tanto para iniciar terapia anticipada como para monitorizar tratamiento antifúngico.

En nuestro primer paciente los niveles de galactomanano pueden estar elevados en el lugar de la infección (localizada en el pulmón) pero no en suero, debido a que el antígeno no es filtrado a los fluidos corporales. Podría deberse al menor grado de angioinvasión de estos pacientes en relación con los neutropénicos y al hecho de estar encapsulado el proceso infeccioso.

Por ello, en pacientes con alta sospecha de AI, además de proceder a determinar la antigenemia de galactomanano en suero, deberíamos realizar conjuntamente la medición de anticuerpos anti-*Aspergillus*, ya que esto explicaría la baja sensibilidad del test en pacientes no neutropénicos y en algunos enfermos oncológicos no intensamente inmunodeprimidos. Otras veces el galactomanano se positiviza, pero lo hace de forma tardía, como en el caso de nuestra segunda paciente, no anticipándose ni a la sintomatología clínica, ni a la radiología ni al tratamiento antifúngico administrado, con lo cual la terapia anticipada que permitiría aumentar la supervivencia de estos enfermos no llega a instaurarse.

Tan sólo hemos expuesto nuestra experiencia con dos pacientes inmunosuprimidos no neutropénicos, sabiendo que nuestras conclusiones están muy limitadas, y que más estudios serían necesarios realizar en esta población no hematológica.

Platelia-Aspergillus®: experiencia en pacientes hematológicos en el Hospital de la Vall d'Hebrón

E. Soriano¹, V. Rodríguez¹, I. Ruiz², T. Olivé³, G Prats¹.
 Servicios de Microbiología¹, Enfermedades Infecciosas² y Hematología³,
 Hospitals Vall d'Hebrón, Barcelona

Introducción La aspergilosis invasiva (AI) actualmente sigue siendo una enfermedad con una alta prevalencia entre pacientes inmunodeprimidos, tales como onco-hematológicos y trasplantados, entre los que existe una tasa de mortalidad por esta enfermedad cercana al 100%. Así, el diagnóstico temprano de la AI se hace imperativo para aumentar la esperanza de vida de estos pacientes. Hasta hace unos años el diagnóstico se hacía teniendo en cuenta síntomas clínicos, radiológicos y criterios microbiológicos, pero ahora se cuenta con técnicas inmunológicas basadas en la detección de antígeno. Entre ellas la detección de galactomanano, un exoantígeno polisacárido que producen *Aspergillus* spp detectable en suero y orina cuya investigación está estandarizada y comercializada por BIO-RAD en su kit Platelia-Aspergillus®. Teóricamente éste permite la detección de galactomanano en las primeras fases de la infección y antes de la aparición de síntomas clínicos.

Objetivo: Realizar un seguimiento de un grupo de pacientes hematológicos pertenecientes a la Unidad de Hematología del hospital de la Vall d'Hebrón utilizando este kit diagnóstico para evaluar su eficacia.

Material y métodos Hasta la fecha (30 Mayo 2003) se han sometido a test los sueros de un total de 43 pacientes, de los cuales se han seleccionado 20 para esta evaluación preliminar: 4 pediátricos, 9 hombres y 7 mujeres que fueron agrupados siguiendo el consenso internacional de las infecciones fúngicas invasivas en las categorías de: probada, probable y posible. Se estudiaron 132 sueros, recogidos dos veces por semana, según instrucciones del fabricante.

Resultados y comentarios: La especificidad de la prueba fue del 93,33% y la sensibilidad del 78,96 %. Cinco pacientes del total mostraron sueros con índices positivos, que además fueron reproducibles (11 de 14 sueros) lo que sitúa la tasa de reproducibilidad en el 78,6 %. De estos 5 pacientes que resultaron ser definitivamente positivos, sólo uno de ellos estaba afecto realmente por AI. Éste tuvo cuatro muestras positivas con índices elevados, aislándose *Aspergillus* en esputo y mostrando lesiones pulmonares e infiltrado subpleural. El diagnóstico clínico fue realizado cuatro días antes de que el paciente mostrara antigenemia positiva. Actualmente se encuentra estable y en tratamiento ambulatorio. De los restantes, uno fue diagnosticado de leishmaniasis visceral (tuvo 3 sueros positivos evaluados y consecutivos, con índices superiores a 2); otro resultó estar infectado por un hongo distinto a *Aspergillus* y los tres restantes corresponden a pacientes pediátricos. Existen referencias en la bibliografía que explican la positividad de los niños, ya que se sabe que el galactomanano presente en alimentos tales como la leche, el arroz y en suplementos proteínicos pasa a la sangre a través de la mucosa intestinal. No está descrita una posible reacción cruzada con *Leishmania donovani* complex.

Tres pacientes adicionales mostraron índices entre 1 y 1,5, habiéndose de considerar como dudosos; dos de estos pacientes eran niños y el tercero estaba afecto de candidiasis sistémica por *Candida parapsilopsis*.

Determinación de ADN de Aspergillus en el suero de ovejas afectadas de mastitis aspergilar

José L. Blanco, Consuelo Durán, Mar Cruzado, Marta Andriño, Marta E. García
 Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Los métodos actuales de diagnóstico de aspergilosis no han demostrado ser lo suficientemente sensibles y específicos como para permitir un diagnóstico temprano y eficaz de la enfermedad, lo que hace que siga la búsqueda de una metodología óptima de diagnóstico.

En el presente trabajo tuvimos ocasión de estudiar 20 sueros procedentes de animales diagnosticados clínica, microbiológica y/o histopatológicamente de padecer mastitis aspergilar ovina, un proceso de aparición esporádica, del que se han descrito distintos brotes en nuestro país en los últimos años. Sobre este suero aplicamos la técnica *nested* PCR, siendo comparados los resultados con la determinación de galactomanano mediante el test comercial PLATELIA, y la determinación de inmunoglobulinas IgG anti-*Aspergillus* mediante un ELISA indirecto. Recordemos que esta última técnica, desarrollada en nuestro laboratorio, se ha mostrado útil para el diagnóstico de este tipo de procesos en animales.

La totalidad de los 20 sueros resultaron positivos por la técnica ELISA, 16 (80%) fueron positivos por PCR, y 11 (55%), incluyendo como tales los dudosos, fueron positivos por PLATELIA.

En cuanto a los sueros control, todos ellos resultaron negativos en las técnicas ELISA y PCR, mientras que por PLATELIA uno resultó positivo y otro dudoso, con unos índices de 1.605 y 1.062 respectivamente.

En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se aplica una técnica PCR al diagnóstico de aspergilosis en animales domésticos, lo que acrecienta la importancia del presente trabajo, al tratarse de animales infecta-

dos de forma natural, y por tanto, cuyas posibles aplicaciones futuras al diagnóstico de la aspergilosis invasora humana deberán ser tratadas. Consideramos nuestros resultados como muy prometedores de cara a su posible aplicación en medicina humana, donde una metodología de diagnóstico sensible, específica y temprana resulta cada día más esencial.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad 00/0016-02.

Nuestro agradecimiento al Laboratorio de Diagnóstico de Mastitis Ovina y Caprina del Departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria de la UCM por proporcionarnos los sueros con los que efectuamos el presente estudio.

Diagnóstico molecular de una endoftalmítis y queratitis producida por *Alternaria infectoria*

Consuelo Ferrer¹, Javier Montero¹, Jorge L. Alió^{1,2}, José L. Abad¹, José M. Ruiz-Moreno^{1,2} y Francisca Colom¹

¹Instituto Oftalmológico de Alicante y ²Universidad Miguel Hernández, Alicante

Se presenta el primer caso de endoftalmítis y queratitis producida por la especie *Alternaria infectoria*. El diagnóstico micológico se estableció mediante métodos moleculares y se confirmó mediante cultivo. La rapidez en la obtención de resultados basados en biología molecular, supuso la resolución del proceso sin secuelas.

Descripción del caso: Varón de 65 años que presenta perforación de córnea por traumatismo con una rama de limonero. En primer lugar es atendido en su hospital local donde, tras realizarle una faecoemulsificación y suturarle el ojo, se le instaura un tratamiento empírico con esteroides y antibióticos de amplio espectro. Tras dos meses de tratamiento y dada la mala evolución del proceso, el paciente acude a nuestro centro para una segunda opinión. Presenta tanto afección corneal (queratitis) como invasión del globo ocular (endoftalmítis).

Diagnóstico micológico: Se obtuvieron muestras de raspado corneal para diagnóstico microbiológico que fueron procesadas tanto por cultivo tradicional como por Biología molecular (PCR y DNA-typing). Cinco horas después de la toma de muestras el resultado de la amplificación por PCR dio positivo para la detección de DNA fúngico e inmediatamente se instauró tratamiento con anfotericina B tópica y fluconazol oral. Debido al avanzado grado de invasión del proceso infeccioso, se decidió aplicar una terapia de choque administrando también anfotericina B intravítrea e intravenosa. El resultado del tipado molecular reveló *Alternaria infectoria* como el agente causal, dato que fue confirmado dos semanas después mediante cultivo e identificación por métodos tradicionales. Tras la aplicación tópica y sistémica de terapia antifúngica, el cuadro comenzó a remitir, desapareciendo la inflamación y mejorando la agudeza visual.

Conclusión: Revisada la bibliografía, no se encontró ninguna referencia a infecciones oculares por esta especie. Si bien es cierto que el género *Alternaria* se ha encontrado en numerosas ocasiones como agente causal de queratitis traumáticas, la mayoría de las aportaciones no llegan a la identificación a nivel de especie o encuentran *A. alternata* como agente causal. Los métodos de diagnóstico molecular son una herramienta de extraordinaria utilidad para la detección e identificación de agentes implicados en infecciones fúngicas oculares, ya que permiten instaurar rápidamente una terapia adecuada evitando las graves consecuencias que estos procesos tienen sobre la función y estructura del globo ocular.

Estudio de sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp. a voriconazol por dos métodos de difusión en agar

M. Ramírez, MC. Serrano, E. Cantón, R. Claro, A. Valverde, C. Castro, A. Romero, E. Martín-Mazuelos

OBJETIVO: El propósito de nuestro estudio fue evaluar el método de difusión en disco para determinar la sensibilidad de *Candida* spp. a Voriconazol (V) y compararlo con el E-test.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos estudiado 213 cepas de *Candida* spp. (*C. albicans* 178, *C. glabrata* 26, *C. tropicalis* 9) aisladas de diferentes muestras clínicas. 198 cepas mostraron valores de CMI <2 µg/ml por el método de referencia (NCCLS M27A2) y 15 cepas mostraron valores de CMI 2 µg/ml a V. El estudio de sensibilidad fue realizado mediante el método de difusión en agar, empleando discos de 1 µg de V (Beckton Dickinson) en RPMI 1640 agar suplementado con un 2% de glucosa (RPG), siguiendo las normas del NCCLS (M44 P). El E-test fue realizado siguiendo las normas de la casa comercial. Ambos métodos fueron leídos en el punto donde se observaba una inhibición prominente del crecimiento después de 24 h de incubación a 35 °C.

RESULTADOS: A las 24 h el E-test no fue capaz de detectar ninguna de las cepas con CMI 2 µg/ml a V. Cuando comparamos estos resultados con los halos de inhibición leídos a 24 h observamos que todas ellas excepto una, mostraron halos > 14mm así como el 97.5% de las cepas con CMI <2 µg/ml V.

A las 48 h el E-test detectó 12 de las 15 cepas con CMI 2 µg/ml a V. 11 cepas con CMI <2 µg/ml a V (5.5%), mostraron sin embargo CMI elevadas por E-test a las 48 h. Así mismo, el disco-placa a las 48 h mostró halos de inhibición <14mm en el 86.6% de las cepas con CMI 2 µg/ml a V (13/15)

CONCLUSIONES: 1) Ambos métodos de difusión, E-test y disco-placa, son sencillos, reproducibles y consumen menos tiempo que el método de referencia, por tanto son una alternativa para la mayoría de los laboratorios clínicos. 2) Para las cepas con CMI <2 µg/ml a V la lectura tanto del E-test como del disco-placa puede realizarse a las 24 h, siendo pocas las cepas cuya CMI se modifica a las 48 h. 3) Ambos métodos fallan en la detección de cepas con CMI 2 µg/ml a V a las 24 h, haciéndose esta patente a las 48 h. 4) Tanto las cepas con CMI altas por E-test, como aquellas con halos de inhibición <14mm a las 48h, deben ser interpretadas con cautela, y se recomienda hacer la CMI en estos casos por el método de referencia. 5) Las especies de *C. albicans* muestran una mayor dispersión en los datos debido a la dificultad en la lectura motivada por el efecto *trailing*. 6) Son necesarios más estudios con cepas que presenten valores altos de CMI para V.

Estudio de la sensibilidad de dermatofitos por el método de difusión en placa versus microdilución

C. Castro, M.C. Serrano, R. Claro, M. Ramírez, S. Bernal, A. Berenguer, J. Pemán*, E. Martín Mazuelos

*Servicio de Microbiología H.U. de la Fé, Valencia y Servicio de Microbiología H.U. Valme, Sevilla

OBJETIVO: Comparar la sensibilidad de diferentes especies de dermatofitos a fluconazol (F), itraconazol (I), voriconazol (V) y terbinafina (T) por el método de difusión en placa (D-P) y el método de referencia de microdilución (MD) (NCCLS, M38A).

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos estudiado un total de 46 cepas de dermatofitos (30 *T. mentagrophytes*, 8 *T. rubrum* y 8 *M. gypseum*) aisladas de muestras clínicas. La CMI fue determinada siguiendo el documento de referencia NCCLS M38A. El rango de concentraciones ensayadas fue 0.13 a 64 (mg/l) para F y 0.003 a 16 (mg/l) para I, V y T. El inóculo inicial se realizó a partir de cultivos puros, en placas de agar patata dextrosa (APD), incubadas durante 7 días a 35 °C. Éste se realizó cubriendo las colonias con Tween® 80 y arrastrando la colonia con un asa estéril para obtener una suspensión con turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Los discos y tabletas utilizadas para el método de difusión en placa son V, 1 µg (disco de Becton Dickinson®) e I, F y T 10, 15 y 1 µg respectivamente (tabletas de Neo-Sensitabs®, Rosco, Denmark). Las cepas control utilizadas han sido: *C. parapsilopsis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

RESULTADOS:

| FLUCONAZOL | Halo (mm) | MIC (mg/l) | | | |
|-------------------------------|-----------|------------|----|----|----|
| | | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>T. mentagrophytes</i> (30) | 18 | 1 | 1 | | 1 |
| | >18 | 11 | 2 | 1 | 1 |
| <i>T. rubrum</i> (8) | 18 | 1 | | | |
| | >18 | 4 | 2 | 1 | |
| <i>M. gypseum</i> (8) | 18 | | | | 1 |
| | >18 | | 2 | 1 | 4 |

Las distintas especies estudiadas presentaron halos de inhibición y CMIs para el resto de los antifúngicos estudiados: 30 mm y 1 mg/l; 40mm y 2 mg/l y 60mm y 0.03 mg/l para I, V y T.

CONCLUSIONES: 1) De todos los antifúngicos estudiados el F fue el menos activo y el que presentó menor correlación entre los métodos estudiados, siendo esta correlación menor para *M. gypseum* seguida de *T. mentagrophytes*. 2) Para otros antifúngicos la correlación fue excelente. 3) Más estudios son necesarios incluyendo cepas con altos valores de CMIs.

Actividad antifúngica de voriconazol frente a hongos dermatofitos, y *Scopulariopsis brevicaulis* determinada por el método de difusión en agar NeoSensitabs

A.J. Carrillo-Muñoz¹, D.C. Cárdenes¹, B. Carrillo-Orive¹, V. Rodríguez², O. del Valle², J. Casals³, G. Quindós⁴
¹Dep. Microbiología, ACIA, S. Microbiología; ²Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; ³Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca y ⁴D. Microbiología, Universidad del País Vasco, Bilbao. acarrillo@ya.com

Se ha estudiado la sensibilidad de 247 hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis* a voriconazol, itraconazol y fluconazol, mediante una técnica de difusión en agar (NeoSensitabs, Rosco, Dinamarca). Los hongos fueron obtenidos a partir de pacientes diferentes, durante el primer trimestre de 2003 e identificados por medios bioquímicos y morfológicos habituales. Para la obtención de las suspensiones de inóculo, se utilizaron cultivos puros obtenidos de 7-14 días en medio sólido de patata dextrosa (Biolife™ Italiana, Milán, Italia) a 28 °C. Los elementos fúngicos que sirvieron de inóculo se obtuvieron por arrastre de la superficie, con 10 ml de suero fisiológico (0,85% de NaCl) y Tween® (Disco®, Detroit, USA). La suspensión de conidios y fragmentos de hifas fue homogeneizada con un agitador de tubos durante 15s y se ajustó la turbidez del sobrenadante con suero fisiológico hasta un Standard 0,5 de la escala de McFarland correspondiente a una transmitancia de 68-70% medida 530nm de longitud de onda. Tras agitar los tubos con las suspensiones se inundó la superficie del agar. Se permitió un tiempo de contacto de 15 minutos y se retiró el contenido líquido sobrante. Se depositaron las tabletas de antifúngico y se incubaron a 28 °C durante un mínimo de 2 días antes de realizar la lectura de los halos de inhibición. El criterio seguido para la lectura fue el establecido para levaduras.

Los resultados obtenidos (Tabla) indican que el 87,4% de los hongos ensayados eran sensibles a voriconazol mientras que 78,1% lo eran a itraconazol y el 43,3% a fluconazol. El mayor porcentaje de resistencia se obtuvo para voriconazol y únicamente entre 18 aislamientos de *S. brevicaulis*. Entre los hongos dermatofitos no se comprobó resistencia a voriconazol y entre las especies de mayor sensibilidad a voriconazol destaca *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis* y de forma comparativa *T. rubrum*.

A pesar de que el tratamiento de las dermatofitosis no es una indicación prioritaria en el caso de voriconazol, los resultados obtenidos son excelentes en comparación con itraconazol y fluconazol frente a hongos dermatofitos. Ambos antifúngicos han sido utilizados en el tratamiento de este tipo de infecciones, por lo que voriconazol podría ser una alternativa útil. Por otro lado, NeoSensitabs, se es una técnica útil también en el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos en hongos dermatofitos y *S.brevicaulis*.

Tabla. Distribución de la sensibilidad entre 247 aislamientos de hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis*.

| | VORICONAZOL | | | ITRACONAZOL | | | FLUCONAZOL | | |
|-------------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| | S | S-DD | R | S | S-DD | R | S | S-DD | R |
| <i>E. floccosum</i> (18) | 18 | - | - | 18 | - | - | 18 | - | - |
| <i>T. rubrum</i> (84) | 80 | 4 | - | 74 | - | 10 | 42 | 6 | 36 |
| <i>T. mentagrophytes</i> (42) | 34 | 7 | - | 29 | 1 | 11 | 8 | 5 | 28 |
| <i>M. canis</i> (34) | 34 | - | - | 29 | 1 | 4 | 20 | 3 | 11 |
| <i>T. interdigitale</i> (13) | 12 | 1 | - | 9 | - | 4 | 2 | 5 | 6 |
| <i>T. violaceum</i> (9) | 9 | - | - | 8 | - | 1 | 5 | - | 4 |
| <i>M. gypseum</i> (6) | 5 | 1 | - | 6 | - | - | - | - | 6 |
| <i>T. soudanense</i> (6) | 6 | - | - | 6 | - | - | 5 | - | 1 |
| <i>T. tonsurans</i> (5) | 5 | - | - | 4 | - | 1 | 1 | 1 | 3 |
| <i>T. schoenleinii</i> (4) | 4 | - | - | 4 | - | - | 4 | - | - |
| <i>M. audouinii</i> (4) | 4 | - | - | 3 | - | 1 | 1 | - | 3 |
| <i>M. racemosum</i> (1) | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>T. equinacei</i> (1) | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>T. terrestre</i> (1) | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>S. brevicaulis</i> (20) | 2 | - | 18 | 2 | 2 | 16 | - | 1 | 19 |
| Global | 87,4% | 5,3% | 7,3% | 78,1% | 1,6% | 20,2% | 43,3% | 8,5% | 48,2% |

Interacciones *in vitro* de antifúngicos clásicos y nuevos frente a *Fusarium*

Montserrat Ortoneda¹, Javier Capilla¹, F. Javier Pastor¹, Isabel Pujol², y Josep Guarro¹
¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, ²Laboratori de Microbiologia, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Hemos estudiado la actividad *in vitro* de seis antifúngicos en combinaciones de dos frente a 5 cepas de *Fusarium solani*, 3 cepas de *Fusarium verticillioides* y 3 cepas de *Fusarium oxysporum* utilizando un método de microdilución. Fueron evaluadas las interacciones de anfotericina B (AMB) con terbinafina (TBF), itraconazol, voriconazol, albaconazol, y ravuconazol, y las interacciones de la TBF con los mismos azoles utilizando el índice de concentración fraccional inhibitoria (FICI). En general los seis antifúngicos mostraron escasa actividad cuando fueron ensayados por separado. En cuanto a las combinaciones, 44 de los 99 ensayos resultaron sinérgicos (FICI <1), mientras que 40 fueron aditivos (FICI = 1), 3 subaditivos (FICI >1, <2) y 14 indiferentes (FICI = 2). Las combinaciones de AMB con cualquiera de los agentes antifúngicos produjo, en general, un bajo número de interacciones sinérgicas. El porcentaje más elevado de interacciones sinérgicas (87,5%) fue para la TBF combinada con cualquiera de los azoles frente a *F. verticillioides* y *F. oxysporum*.

Tabla. Distribución de las combinaciones de dos antifúngicos que resultaron sinérgicas.

| Especie (núm. cepas) | AMB | | | | | TBF | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | ITZ | VCZ | ACZ | RVZ | TBF | ITZ | VCZ | ABZ | RVZ |
| <i>F. solani</i> (5) | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| <i>F. verticillioides</i> (3) | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| <i>F. oxysporum</i> (3) | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 |

Actividad *in vitro* de los nuevos agentes antifúngicos frente a *Chaetomium*

Carolina Serena, Montserrat Ortoneda, Javier Capilla, F. Javier Pastor, Josep Guarro
 Unidad de Microbiología, Facultat de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Chaetomium es un agente etiológico inusual de infecciones humanas. Este ascomiceto produce, sin embargo, una tasa de mortalidad considerablemente alta en pacientes inmunodeprimidos. Se ha investigado la actividad *in vitro* de ravuconazol, voriconazol, albaconazol, micafungina y anfotericina B frente a 19 cepas pertenecientes a tres especies de *Chaetomium* (*C. globosum*, *C. atrobrunneum*, *C. nigricolor*) y una cepa de *Achaetomium strumarium*. Se ha utilizado el método de microdilución de referencia para hongos filamentosos recomendado por la NCCLS (documento M38-A) con algunas modificaciones. La micafungina no mostró ninguna actividad frente a las cepas ensayadas, mientras que los tres triazoles mostraron CMI y CME muy bajas, siendo sus medias geométricas inferiores a 0.4 y 0.3 µg/ml, respectivamente.

Tabla. CMI, CME y CML de los cinco agentes antifúngicos ensayados.

| Agentes antifúngicos | CMI (µg/ml) | | CME (µg/ml) | | CML (µg/ml) |
|----------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|------------------|
| | Rango | Media geométrica | Rango | Media geométrica | Media geométrica |
| Anfotericina B | 0.5-8 | 2.75 | 0.5-8 | 2.75 | 29.3 |
| Micafungina | 64 | 64 | 0.5-64 | 9.2 | - |
| Voriconazol | 0.12-0.5 | 0.35 | 0.06-0.5 | 0.28 | 32 |
| Albaconazol | 0.06-1 | 0.25 | 0.06-0.5 | 0.18 | 30.8 |
| Ravuconazol | 0.06-1 | 0.24 | 0.03-0.5 | 0.11 | 32 |