

COMUNICACIONES

A) MICOSIS EMERGENTES

***Cryptococcus neoformans* organismo social en poblaciones microbianas: Una estrategia de supervivencia ambiental como mecanismo de patogenicidad en humanos**

Susana Frases y Arturo Casadevall
Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

Cryptococcus neoformans es un patógeno emergente, oportunista y no es considerado comensal humano. Aparentemente, no presenta requerimientos para un hospedador animal en su replicación y supervivencia, aunque es capaz de causar enfermedad en numerosos hospedadores animales en circunstancias específicas que a menudo implican deficiencias en el sistema inmunitario. Cuando *C. neoformans* se aísla de su hábitat natural, las células presentan, activos, diversos mecanismos biológicos, que posteriormente pasan a actuar como mecanismos de patogenicidad, y que el hongo utiliza para producir daño en el hospedador.

El desarrollo de mecanismos de virulencia contra ciertos mamíferos, incluido el hombre, originados y mantenidos por la interacción con otros microorganismos ha estimulado el interés por el estudio de las interacciones entre *C. neoformans* con protozoos, hongos deslizantes y bacterias. Al igual que otros grupos de hongos patógenos, *C. neoformans* comparte nicho ecológico con diversos microorganismos y consecuentemente compete por el espacio y los nutrientes, lo que le genera cierta presión de selección por el ambiente, produciendo el desarrollo de estrategias y la capacidad de desarrollar mecanismos de patogenicidad y virulencia que juegan un importante papel en promover la supervivencia de *C. neoformans* en su interacción con predadores ambientales y que a su vez le permiten producir infección en hospedadores inmunocompetentes.

Dos de los factores de virulencia más importantes en *C. neoformans* son la capacidad de producir cápsula y melanina. Estudios inmunológicos revelan que la cápsula de *C. neoformans* es antifagocítica y quizás presenta distintas funciones en virulencia al igual que la cápsula de las bacterias patógenas, lo que supone un ejemplo de evolución convergente si pensamos en el hecho de que predadores ameboides utilizan la fagocitosis para nutrirse y las células del sistema inmunitario del hospedador utilizan la fagocitosis como mecanismo de defensa.

Mientras estudiábamos la interacción de *C. neoformans* con *Dictyostelium discoideum* observamos la presencia de colonias marrones originadas por *C. neoformans* cuando la levadura entraba en contacto con *Klebsiella aerogenes*, bacteria que es utilizada como alimento por *Dictyostelium*. Este hallazgo revela ser de gran importancia ya que como muchos otros hongos, *C. neoformans* produce melanina pero la síntesis del pigmento requiere substratos exógenos. Hasta el momento, únicamente catecolaminas tales como L-dopa, epinefrina y norepinefrina, habían sido descritas como sustratos de melanización en *C. neoformans*. Cuando *C. neoformans* se aísla del ambiente la mayoría de células presentan pigmentos melanoideos cuyos precursores, en estos casos, son desconocidos. La síntesis de melanina está asociada con la reducción de la susceptibilidad fúngica a distinta variedad de factores estresantes, que este organismo puede encontrar en el ambiente, como depredación por amebas, luz UV, temperaturas extremas y metales pesados. A su vez la producción de melanina esta asociada con su virulencia en el hospedador.

Nosotros presentamos la interacción entre diversas bacterias y un hongo patógeno humano, *C. neoformans*, que resulta en la producción de un mecanismo de virulencia en un hongo oportunista. Nuestro estudio es el primer ejemplo de melanización fúngica dependiente de bacterias y sugiere un mecanismo potencial por el cual los hongos que expresan lacasas pueden sintetizar melanina en comunidades microbianas. Estas observaciones suponen un precedente en la explicación del origen de los sustratos de melanización para *C. neoformans*.

Incidencia de dermatofitosis en el periodo 2004-2005

Ángel David García-Mayorgas, Francisco Franco-Álvarez de Luna, Francisco Solís, Manuel Casal y María José Linares
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba y Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

Las dermatofitosis son enfermedades infectocontagiosas de distribución mundial. A pesar de contar con mejores tratamientos, tanto tópicos como sistémicos, su incidencia ha aumentado. El conocimiento de los agentes etiológicos y las fuentes de contagio es fundamental para la prevención y control sanitarios de las dermatofitosis y la elección del tratamiento sistémico a emplear en algunas de ellas.

Revisamos retrospectivamente los aislamientos procedentes de muestras de pacientes con sospecha clínica de dermatofitosis remitidos a nuestro laboratorio durante los años 2004 y 2005. En todos ellos se procedió a la toma de muestras recogiendo el borde activo de la lesión, fragmentos de uña, escamas y pelos por las técnicas habituales. El material se cultivó en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol para su primer aislamiento. Tras una incubación de 28 días a 25 °C los hongos filamentosos aislados se sembraron en Agar Patata dextrosa y se procedió a su identificación por las técnicas habituales.

Se detectaron 38 dermatofitosis. Más de la mitad de las muestras (22) procedieron de uñas y piel de los pies. Los dermatofitos más frecuentes fueron *Trichophyton rubrum* (18) y *Trichophyton mentagrophytes* (9), a diferencia de otros estudios en que el segundo lugar de frecuencia lo ocupa *Microsporium canis*, para nosotros el tercero con cinco aislamientos. Siguieron *Trichophyton interdigitalis* (3), *Trichophyton tonsurans* (2) y *Microsporium audouini* (1).

Llama la atención que tras un largo período sin detectar casos de *Tinea capitis*, en los últimos seis meses se han diagnosticado cinco casos. También destaca la ausencia de *Epidermophyton floccosum* en la casuística presentada.

Criptococosis por *Cryptococcus albidus* en un paciente inmunocompetente

Alejandro Jover¹, Consuelo Ferrer², Alberto Morán³, Jesús Gutiérrez² y M^a Francisca Colom¹

¹Laboratorio de Micología; Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Alicante, ²Instituto Oftalmológico de Alicante, Vissum, Alicante y ³Hospital de León, León

Comunicamos un caso de Criptococosis con una presentación clínica anómala: meningoradiculitis, que evoluciona a poliradiculitis asimétrica de extremidades inferiores, producido por una especie muy pocas veces descrita como patógeno humano –*Cryptococcus albidus*– y en un paciente inmunocompetente de 68 años de edad. El paciente ingresó en el Hospital de León por el cuadro de afectación meningoradicular. En estudios complementarios destaca una lesión pulmonar cavitada en ápex izquierdo e infiltrados en ambos lóbulos superiores; VSG (1^a hora) de 120 y líquido cefalorraquídeo (LCR) patológico (glucosa: 48 mg/dl; proteínas: 81 mg/dl y 78 células -98% mononucleares-). Ante la sospecha de tuberculosis se trató con tuberculostáticos hasta obtener el primer cultivo del LCR que ofreció el aislamiento de escasas colonias de una levadura sospechosa de ser *Cryptococcus* spp. En esta muestra se detectó antígeno criptocócico (título: 1/64). La determinación de antígeno en sangre ofreció resultados controvertidos en dos ocasiones (una negativa y otra de dudosa positividad). Se inició terapia antifúngica con anfotericina B liposómica (300 mg/día) y 5-fluorocitosina (2,5 g/8 h). A los 10 días hay mejoría clínica y a los 14 días se sustituye la terapia por fluconazol oral 400 mg/día con el que continúa actualmente con muy buena respuesta clínica.

La levadura aislada fue remitida al laboratorio de micología de la Universidad Miguel Hernández donde se identificó como *Candida parapsilosis*. Ante la persistencia de antígeno criptocócico positivo en títulos bajos en LCR (1/8 a los 6 meses), se nos remitió una muestra muy escasa del mismo que se cultivó y se estudió mediante biología molecular. El cultivo resultó negativo y la amplificación por PCR de la región rDNA 5.8S/ITS mostró una banda limpia que se secuenció y correspondió con levaduras del complejo *Cryptococcus albidus* con una homología de 97%. A los 12 meses de terapia, hay una gran mejoría clínica (camina sin bastones) y se realiza nuevo control de LCR en el que la bioquímica es normal, se ha negativizado el antígeno y sólo la PCR anidada es todavía capaz de detectar genoma fúngico en la muestra. Dado que no hay criterios estandarizados para esta situación, a pesar de que el antígeno criptocócico sea negativo, se decide mantener la terapia con fluconazol oral 400 mg/día hasta que el genoma fúngico sea indetectable.

Este caso resulta excepcional en muchos aspectos, desde la falta de crecimiento in vitro del agente causal a la presentación clínica, el tipo de paciente y el sistema de seguimiento del proceso. No podemos precisar más la identificación del patógeno pero se puede aventurar que se trata de un miembro del complejo *Cryptococcus albidus* que puede dar reactividad cruzada en los tests para detección de antígeno del complejo *Cryptococcus neoformans*, lo que explicaría los títulos bajos en LCR en un proceso neurológico activo y la controversia en la detección en sangre. Por otra parte, puede tratarse de una levadura con requerimientos de cultivo que dificulten su aislamiento aunque hay que considerar que la muestra fue siempre muy escasa y, dado el excelente resultado de la biología molecular, se priorizó la amplificación por PCR frente al cultivo. La última determinación del genoma en LCR, ya en ausencia de antígeno, plantea una interesante discusión sobre el seguimiento de criptococosis en las que se cesa el tratamiento cuando caen los antígenos, pero en las que es muy frecuente que se produzcan recidivas.

Aislamiento de *Candida dubliniensis* en la cavidad oral de personas portadoras de prótesis

Maria Villar-Vidal¹, Cristina Marcos¹, Elena Eraso¹, José López-Vicente², Asier Eguía², Andoni De-Juan², José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

¹Departamentos de ¹Inmunología, Microbiología y Parasitología, y ²Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Candida dubliniensis es una causa emergente de candidiasis relacionada fenotípicamente con *Candida albicans*. Esta especie se asocia principalmente a la producción de infecciones orales en personas inmunodeficientes aunque también puede causar candidiasis invasivas. La menor sensibilidad de *C. dubliniensis* a fluconazol y otros azoles hace necesaria su correcta y rápida identificación.

Se han estudiado muestras de 46 pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco, 17 con diferentes tipos de estomatitis protética y 29 sin estomatitis. Las muestras tomadas tanto de la prótesis dental como de la mucosa subyacente se sembraron en el medio cromógeno Candida ID2 (bioMérieux, Francia). La identificación de los aislamientos se realizó por pruebas micológicas convencionales, como la producción de tubo germinal en suero, morfología microscópica y producción de clamidoconidios en agar harina de maíz, crecimiento a 45 °C y asimilación de sustratos carbonados mediante el sistema ID 32C (bioMérieux). La identificación de *C. dubliniensis* fue confirmada por PCR con primers específicos.

Se aislaron 85 cepas de levaduras en muestras de 36 pacientes (36 de 46, 78,3%): 42 de las muestras de prótesis y 43 de la mucosa oral. Se aislaron levaduras en 20 pacientes sin estomatitis protética (70,0%) y en 16 con estomatitis (94,1%). La especie más frecuente fue *C. albicans* (63,5% de los aislamientos). Otras especies aisladas fueron: *Candida tropicalis* (17,6%), *Candida glabrata* (11,8%), *Candida guilliermondii* (2,4%), y *C. dubliniensis* y *Candida krusei* (ambas 1,2%). *C. dubliniensis* se aisló en una muestra de la mucosa oral de una paciente con estomatitis protética tipo I, en la que también se aisló *C. krusei*. En la muestra de la prótesis de esta paciente no se aislaron levaduras.

C. dubliniensis es una especie que puede colonizar la mucosa oral de personas sin inmunodeficiencia y puede ser un cofactor potencial del desarrollo de algunas estomatitis protéticas.

¿Patógenos emergentes o mejores métodos de diagnóstico? Parte I

Alejandro Jover¹, M^a Francisca Colom¹, Alfredo Zorraquino³, José Luis Rodríguez-Prats², Alejandra Rodríguez² y Consuelo Ferrer²
¹Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, ²Instituto Oftalmológico de Alicante, Vissum, Alicante y ³Hospital Universitario de San Juan, Alicante

En los últimos años el aumento en el número de individuos con algún tipo de inmunosupresión ha provocado un aumento directo de infecciones oportunistas. Aunque los hongos patógenos más comunes siguen siendo *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* cada vez se describen con más frecuencia infecciones producidas por especies previamente consideradas como no patógenas. La epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas está cambiando gracias a la utilización de nuevas técnicas de diagnóstico mucho más sensibles que los métodos tradicionales de cultivo, por ello nos planteamos si estos nuevos casos son realmente patógenos emergentes o simplemente patógenos que no podían ser aislados o identificados a nivel de especie por cultivo y que ahora son identificados mediante nuevas técnicas de diagnóstico como la PCR.

En nuestro estudio se procesaron 228 muestras clínicas mediante cultivo y PCR procedentes de centros clínicos de la provincia de Alicante. La identificación a nivel de especie fue realizada basándose en la secuencia de la región ITS-5.8S rRNA y de las 59 especies identificadas por biología molecular 5 de ellas podrían ser consideradas como patógenos emergentes: *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus magnus*, *Candida famata*, *Candida sake* y *Fusarium proliferatum*, de los cuales sólo este último pudo ser aislado por cultivo.

A continuación presentamos dos de estos cinco casos cuyo diagnóstico y/o identificación fue realizado basándose en técnicas moleculares:

1.^{er} caso: Paciente de 76 años afectada de cirrosis hepática crónica asociada a infección por virus de la hepatitis C, insuficiencia renal crónica y diabetes mellitus tipo 2. Tras varios ingresos por ascitis ingresa de nuevo por episodio de descompensación hidrópica que responde a tratamiento diurético. En esta ocasión se detectó *Cryptococcus magnus* mediante biología molecular en líquido ascítico mientras que el cultivo de la muestra y la tinción Gram fueron negativos. Durante su ingreso hospitalario la paciente no recibió tratamiento antifúngico y al alta se pautó tratamiento con ciprofloxacino 500 mg/12 h durante cinco días. La paciente murió semanas después del alta hospitalaria, por lo que se desconoce la causa última de la muerte.

2.^o caso: Paciente de 31 años que acude al servicio de urgencias por úlcera corneal en ojo izquierdo debida a lentes de contacto. Se pauta tratamiento antibiótico con tobramicina, ciprofloxacino y dexametasona cada 8 horas.

Tras dos semanas de tratamiento regresa a consulta presentando hipermia conjuntival y opacidad corneal central. En la exploración se observa absceso ulcerado con edema central algodonoso y se toma muestra para cultivo y PCR. El cultivo de la muestra resulta negativo mientras que se detecta *Candida famata* mediante biología molecular y se pauta tratamiento con anfotericina B, prednisona y ciprofloxacino. Una semana después la córnea presenta mucho mejor aspecto, con una discreta úlcera central de 1 mm que epiteliza completamente transcurridos 16 días después de instaurar tratamiento antifúngico.

¿Patógenos emergentes o mejores métodos de diagnóstico? Parte II.

Consuelo Ferrer¹, M^a Francisca Colom², Alejandra Rodríguez¹, Alejandro Jover¹, Juan J. Perez-Santonja¹ y Jorge Alió¹
¹Instituto Oftalmológico de Alicante, Vissum, Alicante, ²Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Alicante y ³Hospital General de Alicante, Alicante

Presentamos dos casos de patógenos emergentes detectados en muestras oculares, cuyo diagnóstico y/o identificación fue realizado basándose en técnicas moleculares.

1.^{er} caso. Paciente de 66 años que cuatro meses después de someterse a una operación de cataratas desarrolla una endoftalmitis. Fue tratado durante 15 días con esteroides tópicos y tobramicina y viendo que los síntomas persistían se tomaron dos muestras: una de humor acuoso y otra de humor vítreo. La muestra de humor acuoso fue negativa mediante las tres técnicas de diagnóstico empleadas (directo, cultivo y PCR) mientras que la de humor vítreo fue positiva para las tres. El directo mostró hifas septadas, hubo crecimiento en agar glucosado de Sabouraud tras siete días de incubación y la PCR de hongos fue positiva. La identificación a nivel de especie fue realizada basándose en la secuencia de la región ITS-5.8S rRNA, mostrando una homología del 100% con *Fusarium proliferatum*. El tratamiento con anfotericina B local, ketoconazol oral y natamicina tópica resolvió el caso en 2 meses.

2.^o caso. Paciente de 28 años sin antecedentes personales de interés, portadora de lentillas acude al hospital con dolor agudo, secreción mucopurulenta, úlcera corneal e hipopión de 5 mm en ojo izquierdo. Se inicia tratamiento empírico tópico e intravenoso con vancomicina y cefazolina. Tras la obtención de los cultivos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Alcaligenes xylosoxidans*) el tratamiento aplicado es cefazidima y ciprofloxacino tópico y sistémico. A los 13 días persiste el hipopión de 3 mm y el dolor intenso, se toman muestras del absceso corneal para cultivo de *Acanthamoeba* que resultó negativo. Tras 21 días del ingreso en el hospital, la paciente decide venir a nuestro centro donde se realizan cultivos, directo y PCR. Mientras que en el directo se aprecian estructuras compatibles con hifas, los cultivos son negativos. Las PCR realizadas para la detección de HVS-1, adenovirus, *Acanthamoeba* fueron negativas mientras que la PCR para la detección de DNA fúngico fue positiva. La secuencia presentó una homología del 99,4% con *Candida sake*. La paciente lleva un mes de tratamiento con natamicina tópica e itraconazol oral y ya no presenta hipopión y la úlcera está cerrada.

Secuenciación multilocus en *Sporothrix schenckii*

Rita Marimón, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro
Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus

El hongo dimorfo *Sporothrix schenckii* es el agente responsable de la esporotricosis, infección fúngica relevante para el hombre y extendida mundialmente. No obstante, poco se conoce sobre la organización poblacional de esta especie, aunque estudios recientes moleculares y fenotípicos parecen demostrar que existen diferentes linajes genéticos dentro de la misma. El objetivo de este estudio fue determinar, usando un análisis de secuencias multilocus, si esta variabilidad se debía a la divergencia de especies o a la diversidad intraespecífica. Se incluyeron un total de 58 aislamientos de *S. schenckii* (57 de origen clínico y uno de origen ambiental) de un amplio rango de orígenes geográficos. Se obtuvo la secuencia nucleotídica de tres fragmentos correspondientes a porciones de los genes estructurales: quitina sintasa, b-tubulina y calmodulina para cada uno de los aislamientos y éstas se utilizaron en el análisis filogenético. El análisis combinado de los tres loci reveló la presencia de tres grandes clusters, uno agrupaba todos los aislamientos europeos, otro sólo los aislamientos procedentes de Brasil y en el tercero los aislamientos procedentes de otros países sudamericanos, Asia y África. Se obtuvieron un total de 15 ramas soportadas por un índice de bootstrap de un 100%, diez de ellos representando especies crípticas. Nuestros estudios demostrarían que la mayoría de los agrupamientos prevalecen en diferentes regiones geográficas.

Estudio molecular y fisiológico del complejo de especies de *Pseudallescheria boydii*

Fèlix Gilgado, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, Reus

Pseudallescheria boydii (anamorfo *Scedosporium apiospermum*) es la especie responsable de la escedosporiosis humana, infección fúngica con una alta tasa de mortalidad y de difícil tratamiento debido a su elevada resistencia a los antifúngicos actualmente disponibles. Recientemente, hemos realizado un estudio morfológico y molecular con 60 cepas de origen clínico y ambiental procedentes de diferentes regiones geográficas con el objetivo de determinar si realmente *P. boydii* es una única especie o incluye a más de una.

El análisis de secuencias parciales del gen de la β -tubulina (dos loci: BT2 y TUB) y la calmodulina y de la región ITS del ARN ribosomal han demostrado que en realidad *P. boydii* es un complejo de especies. El análisis combinado de las secuencias de los cuatro loci ha mostrado la presencia de un total de 44 haplotipos dentro del complejo. A nivel individual, el fragmento más informativo fue la región TUB, generando la topología más similar al análisis combinado. Tres especies morfológicamente relacionadas con *P. boydii sensu stricto*, como *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* y *Pseudallescheria fusioidea*, que previamente habían sido consideradas como sinónimas de la misma, han podido ser diferenciadas genéticamente y morfológicamente de *P. boydii*. Cabe destacar que dos de los tres aislamientos incluidos en *P. ellipsoidea* procedían de infecciones invasivas.

En base a la existencia de dos clados claramente separados filogenéticamente de las otras especies, hemos propuesto dos nuevas especies para la ciencia, *Pseudallescheria minutispora* y *Scedosporium aurantiacum*. El estudio de sus caracteres morfológicos más relevantes nos ha permitido confirmar esta propuesta. Todos los aislamientos incluidos en *S. aurantiacum* tienen un origen clínico mientras que los incluidos en *P. minutispora* son ambientales. En el estudio fisiológico, se utilizaron un total de 54 pruebas fisiológicas, permitiéndonos las mismas establecer diferencias entre los grupos filogenéticos originados en el análisis multilocus. Posteriormente a este estudio, incrementamos el número de aislamientos del complejo hasta un total de 130, secuenciando únicamente la región TUB del gen de la β -tubulina. Nuevos estudios son necesarios para demostrar si las especies ya propuestas o las crípticas, presentan diferente espectro clínico así como una diferente sensibilidad a los antifúngicos.

Utilidad diagnóstica de dos técnicas serológicas en la candidiasis invasiva

Carmen Castro, Mercedes Ramírez, Elena López, Cecilia Martín,
Antonia I. Martos, Maite Ruiz, Javier Aznar, José Carlos Palomares y
Estrella Martín-Mazuelo
Servicio de Microbiología Hospital Universitario Virgen de Valme y
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

Objetivo: Estudiar la utilidad de dos técnicas serológicas (detección del antígeno y anticuerpo frente a *Candida*) en pacientes neutropénicos ingresados en el H. U. V. del Rocío y en el H. U. V. de Valme.

Pacientes y métodos: Estudiamos 30 pacientes que presentaban factores predisponentes para desarrollar una infección fúngica invasiva (IFI) durante el período de tiempo comprendido entre septiembre de 2004 y junio de 2005. A todos ellos se les tomaron dos muestras de suero semanales, junto a otras muestras, según criterio clínico (hemocultivos, aspirados bronquiales, lavado bronco-alveolar -BAL-...). El cultivo de las muestras se realizó por técnicas convencionales en el laboratorio de Microbiología. Las técnicas serológicas realizadas a dos sueros semanales (un total de 166 sueros) fueron: la determinación del antígeno manano (Ag Platelia Candida®, Bio-Rad) (AG) y del anticuerpo antimanano (Ac Platelia Candida®, Bio-Rad) (AC).

Resultados: Del total de 166 sueros estudiados obtuvimos un resultado positivo para AG en 10 sueros (6%), pertenecientes a tres pacientes del H. U. V. del Rocío. Un total de 20 sueros (12%) pertenecientes a seis pacientes presentaron un título alto (>20 UI/ml) de AC. Dos pacientes presentaron con ambas técnicas en sueros distintos AG y AC positivos, correspondiéndose uno de ellos con un caso de alta sospecha clínica.

Conclusiones:

- 1) El paciente que presentaba alta sospecha de IFI presentó AG positivo y previamente AC positivo.
- 2) Posiblemente el bajo número de resultados positivos se puede deber a la profilaxis antifúngica a la que están sometidos estos pacientes.
- 3) Se necesitan más estudios para poder evaluar el valor predictivo de la serología en este tipo de pacientes.

Evaluación de Bichro-Dubli Fumouze para la identificación rápida de *Candida dubliniensis*

Ismail H. Sahand¹, Sonia Brena¹, Ana Lain¹, M^a Dolores Moragues²,
Raymond Robert³, Guillermo Quindós¹ y José Pontón¹
Departamentos de ¹Inmunología, Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina y Odontología, y ²Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao y ³Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite,
UPRES EA 3142, UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé, Angers, France

Candida dubliniensis se aisló por primera vez en la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH en Dublín por Sullivan et al. (1995). Se han publicado casos de resistencia al fluconazol, antifúngico usado como profiláctico en pacientes infectados por el VIH, en receptores de trasplantes de médula ósea, etc., en donde *C. dubliniensis* es más frecuente. Existe un número limitado de métodos para identificar *C. dubliniensis*, pero no son métodos rápidos, por lo que en este trabajo hemos evaluado un kit de aglutinación de látex (Bichro-Dubli Fumouze, Fumouze Diagnostics, Francia) para la identificación rápida de *C. dubliniensis*. Se estudiaron 106 aislamientos de *C. dubliniensis* (de diferentes genotipos y localizaciones anatómicas). Treinta cepas de *Candida albicans* y una cepa de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae* y *Candida kefyr* se emplearon como controles. Las cepas fueron sembradas simultáneamente en cuatro medios: agar glucosado de Sabouraud, CHROMagar Candida, Candida ID2 y CHROMagar-Pal y se ensayaron con el kit de aglutinación de látex Bichro-Dubli. La prueba fue positiva para 103 de los 106 aislamientos de *C. dubliniensis* y negativa para el resto de las especies ensayadas. La sensibilidad y la especificidad de la técnica fueron 97,1% y 100%, respectivamente. La prueba es muy rápida, sencilla y fiable para identificar *C. dubliniensis*, con independencia de los medios de cultivo de procedencia de las cepas.

Evaluación del medio cromógeno Candi Select 4 para el aislamiento e identificación de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico

Cristina Marcos¹, Tiziana F. Cannizzo¹, Elena Eraso¹, Ismail H. Sahand¹,
María Villar-Vidal¹, M^a Dolores Moragues², José Pontón¹ y
Guillermo Quindós¹
Laboratorio de Micología Médica, Departamentos de ¹Inmunología,
Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, y
²Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao

Las candidiasis son infecciones habituales causadas principalmente por *Candida albicans*. Otras especies, como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* o *Candida guilliermondii*, se están aislando con mayor frecuencia. Una identificación rápida de los aislamientos es de gran ayuda para el diagnóstico y el tratamiento de las candidiasis.

Se ha evaluado la utilidad del medio cromógeno Candi Select 4 (Sanofi Diagnostics, Pasteur, Francia) en comparación con Candida ID2 (bioMérieux, Francia) y CHROMagar Candida (CHROMagar, Francia) en el aislamiento e identificación presuntiva de *C. albicans* basado en la presencia de diferentes actividades enzimáticas. En este estudio se han ensayado un total de 300 aislamientos, incluyendo 120 *C. albicans*, 44 *Candida dubliniensis*, 34 *C. glabrata*, 28 *C. tropicalis*, 22 *C. parapsilosis*, 16 *Candida guilliermondii*, 16 *C. krusei*, 8 *Candida haemulonii*, 4 *Candida lusitanae* y 8 *Cryptococcus neoformans*. La identificación de los aislamientos se confirmó con pruebas micológicas convencionales. Antes del ensayo, cada aislamiento fue subcultivado en agar glucosado de Sabouraud para asegurar su viabilidad. Las placas fueron incubadas a 36 ± 1 °C y la lectura visual se realizó después de 24 y 48 h de incubación por tres investigadoras independientemente.

La mayoría de los aislamientos crecieron bien en los tres medios después de 24 h. de incubación. La diferenciación de *C. albicans* en el medio Candi Select 4 fue sencilla por el color violeta que presentan las colonias, a diferencia del color turquesa de la mayoría del resto de los aislamientos. La sensibilidad y especificidad para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron altas (>95 %) para los tres medios, encontrándose muy pocos aislamientos falsos negativos o falsos positivos. Sin embargo, la diferenciación de otras especies como *C. tropicalis* o *C. krusei* fue más difícil en Candi Select 4 que en los otros dos medios ensayados. El medio cromógeno diferencial Candi Select 4 es eficaz en el aislamiento e identificación de *C. albicans* en 24-48 h. y permite observar claramente la presencia de cultivos mixtos.

COMUNICACIONES

B) UTILIDAD PRÁCTICA DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIFÚNGICOS

Actividad *in vitro* de caspofungina sobre *Candida* spp. determinada por cuatro métodos

Amparo Valentín, Emilia Cantón, M. Romero, Enrique Colombo y Javier Pemán

Servicio de Microbiología y Unidad de Microbiología Experimental, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Introducción: El CLSI (antes NCCLS) no ha estandarizado un método para determinar la actividad de caspofungina, nuevo antifúngico de la familia de las equinocandinas, sobre levaduras.

Objetivo: Determinar la actividad *in vitro* de la caspofungina siguiendo las recomendaciones del documento M27-A2 microdilución en caldo y M44-A, disco difusión, del CLSI para levaduras y por dos métodos comerciales (Sensititre YeastOne [SYO] y Neo-Sensitab tablets).

Métodos: En total se ensayaron 34 cepas de levaduras, 25 procedentes de hemocultivos (8 *Candida albicans*, 5 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida tropicalis*, 3 *Candida krusei*, 3 *Candida glabrata*, 2 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida famata* y 1 *Candida lusitanae*) y 9 *C. albicans* mutantes de laboratorio resistentes a caspofungina (CMI ≥ 4 mg/l). Los métodos M27-A2 y M44-A se realizaron de acuerdo a las condiciones estandarizadas del CLSI/NCCLS. Los métodos SYO y Neo-Sensitab tablets, fueron realizados siguiendo las instrucciones del fabricante. Los discos de caspofungina y Neo-Sensitab tablets utilizados fueron de 5 μ g. Las CMI₅₀ y CMI₁₀₀ obtenidas del método M27-A2 se definieron como la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ y 100% respectivamente. CMI₅₀ por el método de SYO la concentración del primer pocillo color azul (no crecimiento) o púrpura (ligero crecimiento) tras 24 horas de incubación. En todos los ensayos se incluyeron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 (control de calidad) y la de referencia *C. albicans* ATCC 90028. La concordancia entre los métodos de dilución en caldo se estimó como el porcentaje de cepas para las cuales la diferencia entre CMI₅₀ era ≤ 2 diluciones. La correlación entre las CMI₅₀ con los diámetros de inhibición bien por disco o tabletas fue determinada mediante análisis de regresión lineal.

Resultados: Las CMI para las cepas de control de calidad y de referencia se hallaban dentro del intervalo aceptable. El porcentaje global de concordancia entre M27-A2 y SYO fue de 87,16%. Los diámetros de inhibición obtenidos por disco fueron mayores que los obtenidos por las tabletas; aunque se obtuvo mejor correlación con las tabletas que con los discos (R = 0,873 vs. R = 0,690, respectivamente). Los cuatro métodos fueron capaces de identificar las cepas con sensibilidad reducida a la caspofungina (CMI₅₀ ≥ 1 mg/l).

Conclusiones: Los cuatro métodos (M27-A2, M44-A, SYO y Neo-Sensitab tablets) son adecuados para determinar la actividad de caspofungina sobre *Candida* spp., separan bien las cepas resistentes (CMI₅₀ ≥ 2 mg/l), objetivo de las pruebas de sensibilidad.

Actividad *in vitro* de micafungina frente a aislamientos clínicos de *Candida*

Olatz Albaina¹, Elena Eraso¹, Sahand Ismail¹, M^a Dolores Moragues², Alicia I. Arechavala^{1,3}, Alfonso Javier Carrillo-Muñoz⁴, José Pontón¹ y Guillermo Quindós¹

Laboratorio de Micología Médica, Departamentos de ¹Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, y ²Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao, ³Unidad Micología, Hospital FJ Muñiz, Buenos Aires, Argentina y ⁴ACIA-Microbiología, Barcelona

Se ha evaluado la actividad de la equinocandina micafungina (Fujisawa España, actualmente Astellas Europe) frente a 176 aislamientos de levaduras del género *Candida*, tanto de la especie *Candida albicans* (55 aislamientos), como de otras especies con mayor resistencia a fluconazol: *Candida krusei* (20 aislamientos), *Candida glabrata* (36 aislamientos) y *Candida dubliniensis* (65 aislamientos). Los aislamientos se subcultivaron durante 24 h. a 36 ± 1 °C en agar glucosado de Sabouraud y *Candida* ID2 (bioMérieux, Francia) para comprobar su pureza.

El estudio *in vitro* de sensibilidad a micafungina se realizó por el método de microdilución siguiendo el protocolo del documento M27-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, anteriormente NCCLS). Se prepararon suspensiones de levaduras ajustadas a una turbidez de

0,5 McFarland, se diluyeron 1:1000 en RPMI y se sembraron en placas por duplicado. El rango de concentración del antifúngico fue de 16 μ g/ml a 0,03 μ g/ml. La lectura se realizó después de 24 h. y 48 h. a 36 ± 1 °C. Como control de calidad se emplearon las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Se ha observado que la micafungina presenta una potente actividad *in vitro* frente a todos los aislamientos de *C. albicans* evaluados, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI₅₀) entre 0,25 y 0,125 μ g/ml, tanto a 24 como a 48 h. de incubación, no observándose diferencias en la sensibilidad de aislamientos resistentes a fluconazol. La mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* mostraron, sin embargo, menor sensibilidad con valores de CMI₅₀ entre 0,5 y 2 μ g/ml a 24 h. y superiores a 48 h. Los aislamientos de *C. glabrata* presentaron valores de CMI₅₀ entre 0,25 y 2 μ g/ml (a 24 y 48 h) y, por último, los aislamientos de *C. krusei* fueron menos sensibles con valores entre 0,5 y 8 μ g/ml.

Estos resultados indican que la micafungina es un antifúngico muy eficaz frente a los aislamientos clínicos de *Candida* y es una incorporación de gran interés a las herramientas antifúngicas ya existentes.

Interacción de caspofungina-anfotericina B sobre *Candida albicans* con sensibilidad reducida a caspofungina o anfotericina B determinada por curvas de letalidad

Amparo Valentín, Emilia Cantón, M. Bosch, Enrique Colombo y Javier Pemán

Servicio de Microbiología y Unidad de Microbiología Experimental, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

La terapia antifúngica combinada puede optimizar el tratamiento del paciente e impedir el fracaso terapéutico especialmente en pacientes inmunodeprimidos con infección fúngica sistémica. Sin embargo, todavía no se dispone de un método estandarizado para el estudio *in vitro* de la actividad combinada de los antifúngicos.

Objetivo: Determinar la actividad *in vitro* de caspofungina y anfotericina B solos o en combinación sobre cepas de *Candida albicans* con sensibilidad reducida a caspofungina o a anfotericina B por el método de curva de letalidad.

Métodos: Los ensayos se realizaron sobre dos cepas (mutantes de laboratorio) de *Candida albicans* resistentes a caspofungina (CMI 4 y >8 mg/l) y una cepa resistente a anfotericina B (ATCC 200955, CMI >2 mg/l). Las curvas de letalidad se elaboraron en medio RPMI-1640, con un inóculo de 10^5 UFC/ml y en un volumen final de 5 ml. A las 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h se tomaron muestras para determinar las UFC/ml. Las concentraciones ensayadas (CAS/AMB) fueron: 2/0,5; 2/2; 8/0,5 y 8/2 mg/l. Se definió como sinergismo cuando se obtuvo una reducción ≥ 2 log en UFC comparada con el antifúngico más activo solo; como antagonismo si había un incremento en UFC ≥ 2 log con respecto al fármaco menos activo e indiferencia cuando la reducción en el crecimiento estaba comprendida entre <2 y >1 log.

Resultados: Durante las primeras seis horas de incubación se obtuvo una reducción de 1,5 a 2,7 log en UFC con 8 y 2 mg/l de CAS en las cepas resistentes a caspofungina, pero a las 48 h se recuperó el crecimiento. A las 2 h de incubación, con 2 mg/l de anfotericina B no quedaron células viables de las cepas resistentes a caspofungina, mientras que con 0,5 mg/l se observaron células viables a las 48 h. Sobre la cepa ATCC 200955, caspofungina (8 mg/l) necesitó 48 h de incubación para matar a todas las células. La interacción caspofungina-anfotericina B fue indiferente en las tres cepas ensayadas.

Conclusiones: anfotericina B mostró actividad fungicida sobre las cepas resistentes a caspofungina. Por el contrario, la actividad letal de caspofungina sobre la cepa resistente anfotericina B resultó menos intensa o disminuida. No hubo interacción anfotericina B – caspofungina.

Cryptococcus neoformans: *in vitro* resistance to three azoles

Rosa María Claro, Ana Isabel Aller, M^a Francisca Colom*, Mercedes Ramírez, Carmen Castro, Elena López, Ana Romero and Estrella Martín-Mazuelos

Microbiology Service, Hospital Universitario Virgen de Valme, Seville and *Department of Medicine, Miguel Hernández University, Alicante

Objective: Although some fluconazole resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* have been reported in the last years, there is not so much in the case of voriconazole because of its more recent introduction. The aim of this study is to know the rates of resistance to fluconazole, itraconazole and voriconazole of *C. neoformans* and to evaluate the possible existence of cross-resistance mechanisms.

Methods: A total of 80 *C. neoformans* isolates from HIV patients were studied. 29 of them were obtained from patients without HAART from 1994 to 1996; the other 51 were obtained from patients with HAART from 1997 to 2003. The susceptibility to fluconazole, itraconazole and voriconazole of the first group and the susceptibility to fluconazole and voriconazole of the second one were performed by the broth microdilution

tion method according to the NCCLS guidelines (M27-A2 document). Fluconazole and voriconazole were provided by Pfizer and itraconazole by Janssen. Fluconazole was dissolved in sterile distilled water, whilst itraconazole and voriconazole were dissolved in dimethylsulphoxide. RPMI medium (Sigma, St Louis, MO, USA) was used for all drugs. The final concentrations were 0.12–64 mg/l for fluconazole and 0.015–8 mg/l for itraconazole and voriconazole. For all drugs, MIC values were the lowest drug concentration which inhibited growth by the 50% (prominent inhibition of growth) compared with the control. The chosen breakpoints were: Fluconazole: ≤ 8 mg/l (S) and ≥ 16 mg/l (SDD/R) according to Aller et al. (Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1544–1548). Itraconazole: ≤ 0.125 mg/l (S) and ≥ 0.25 mg/l (SDD/R) according to the last NCCLS guidelines. Voriconazole: ≤ 1 mg/l (S) and ≥ 2 mg/l (SDD/R) as suggested by Gibbs et al. (In vitro activity of voriconazole and fluconazole vs > 8000 *C. glabrata* isolates. 15th ECCMID. P1740)

Results: The next table shows the MICs obtained for the tested drugs.

Drug	MIC (mg/l)	No. of isolates (%)		
		Pre - HAART	HAART	Total
Fluconazole	≥ 16 (SDD/R)	5 (17.24%)	0 (0%)	5 (0.25%)
	≤ 8 (S)	24 (82.76%)	51 (100%)	75 (93.75%)
Itraconazole	≥ 0.25 (SDD/R)	28 (96.5%)	40 (78.4%)	68 (85%)
	≤ 0.125 (S)	1 (3.5%)	11 (21.6%)	12 (15%)
Voriconazole	≥ 2 (SDD/R)	3 (10.34%)	0 (0%)	3 (3.75%)
	≤ 1 (S)	26 (89.66%)	51 (100%)	77 (96.25%)

Conclusions:

- 1) All the *C. neoformans* isolates with voriconazole MIC ≥ 2 mg/l had high MICs for fluconazole and itraconazole too. All of them were isolated in the pre-HAART era, when voriconazole was not used yet, so a cross-resistance mechanism could be implicated.
- 2) There wasn't found any susceptible dose dependent or resistance fluconazole or voriconazole *C. neoformans* isolate in the HAART era.

Comparación de ATB Fungus 2 vs. microdilución para el estudio de la sensibilidad in vitro a azoles (fluconazol e itraconazol) de *Cryptococcus neoformans*

Elena López Oviedo, Bernardo Flores, Ana Isabel Aller, Carmen Castro, Cecilia Martín, Antonia I. Martos y Estrella Martín-Mazuelos
Hospital Universitario Virgen de Valme, Servicio de Microbiología, Sevilla

Objetivos: Evaluar la utilidad del método ATB Fungus 2 (AF2) (bioMérieux.) para el estudio de la sensibilidad "in vitro" a los azoles, fluconazol (FCZ) e itraconazol (ITZ), de *Cryptococcus neoformans* comparándolo con el método de referencia de microdilución CLSI M-27 A2 (CMI). **Materiales y métodos:** Se estudiaron 50 cepas de *C. neoformans* de colección. Como control de calidad se emplearon las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. El estudio in vitro de sensibilidad a los antifúngicos se realizó con el método semiautomático ATB Fungus 2, con lectura visual, que incluye entre otros, a los antifúngicos FCZ (rango de concentraciones de 0,5 a 64 $\mu\text{g/ml}$) e ITZ (rango de concentraciones de 0,125 a 4 $\mu\text{g/ml}$). La lectura se realizó tras 48 y 72 h a 35 °C. Los resultados se expresaron en: 1) Rango, CMI₅₀ y CMI₉₀, 2) Grado de correlación (GC) (valorando como idénticas CMI₅₀ en un rango de +/- 2 diluciones), 3) Discrepancias [(muy mayores (DMM), sensibles por el AF2 y resistente por el método de referencia; mayores (DM), resistentes por el AF2 y sensible por el método de referencia y menores (dm), intermedia o SDD por un método y sensible o resistente por el otro)]. **Resultados:** Tabla 1: Resultados a las 48 h de lectura.*

	ATB Fungus 2			CMI			GC (48/48)	DMM	DM	dm
	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀				
FLZ	0,5-16	2	8	0,5-8	2	8	98%	0%	0%	2%
ITZ	$\leq 0,12-0,5$	$\leq 0,12$	0,25	$\leq 0,12-1$	0,25	0,5	98%	8%	0%	56%

*No se observaron diferencias significativas a las 72 h.

Conclusiones:

- 1) Existe una excelente correlación entre ambos métodos.
- 2) AF2 es un método sencillo que podría ser utilizado de rutina en laboratorios para determinar la sensibilidad in vitro a azoles de *C. neoformans*.
- 3) Se necesitan más estudios con cepas con CMI₅₀ más altas a azoles y datos de correlación in vivo.

Sensibilidad in vitro de *Sporothrix schenckii* a seis antifúngicos utilizando tres métodos diferentes

Eidí Alvarado, Josep M. Torres-Rodríguez, Teresa Jiménez y Edgar Neyra*
Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia (URMIM), IMIM, Barcelona y *Departamento de Microbiología. Instituto de Medicina Tropical von Humbolt Lima, Perú

La información sobre la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de *Sporothrix schenckii* es escasa y los métodos de estudio han sido diversos.

Se ha determinado la sensibilidad de la fase miceliar de *S. schenckii* a la anfotericina B (AB), 5-fluorocitosina (FC), fluconazol (FZ), itraconazol (IZ), voriconazol (VZ) y ketoconazol (KZ) utilizando un método de referencia, el M38-P, y dos técnicas comerciales, el Sensititre YeastOne® (SYO), y el ATB® Fungus2 (ATB2).

Se han utilizado 20 aislamientos clínicos de *S. schenckii* procedentes de Perú conservados en la colección del URMIM. Los inóculos se han preparado con conidias de cultivos de cinco días a 30 °C en medio de agar glucosado Sabouraud, ajustándose a las condiciones de cada técnica. Dos cepas ATCC de *Candida* se usaron como controles de calidad.

Cuatro antifúngicos (AB, FC, FZ e IZ) fueron comunes a los tres métodos, el VZ al M38-P y SYO; y el KZ sólo se ensayó en SYO. Las lecturas visuales de los puntos finales se realizaron a los tres días (SYO) y a los cuatro días para M-38P y ATB2.

Todos los aislados mostraron CMI₅₀ muy elevadas para la FC y FZ. Las CMI 50% más homogéneas y bajas se obtuvieron con el IZ, observándose una buena concordancia con los tres métodos (0,25 – 1,0 $\mu\text{g/ml}$). El KZ también presentó unas CMI 50% bajas (0,25 $\mu\text{g/ml}$). El rango de CMI para el VZ fue variable (0,5-16 $\mu\text{g/ml}$), con CMI 50% ≈ 2 $\mu\text{g/ml}$.

La variabilidad también se comprobó con la AB (rango 0,06-16 $\mu\text{g/ml}$), con MIC50% de 0,5 a 1 mg/ml. Al considerar los valores de CMI 90%, la concordancia entre los métodos resultó mucho menor.

Los resultados obtenidos demuestran que in vitro el IZ y el KZ son los antifúngicos más activos sobre *S. schenckii*; que existe gran variabilidad cepa-dependiente para AB y VZ, mientras que no son activos el FZ y la FC. Los menores valores de CMI se obtuvieron con el SYO, pero la concordancia entre los tres métodos fue buena, exceptuando el VZ.

Actividad in vitro de voriconazol frente a *Prototheca wickerhamii*

Francisco Franco-Álvarez de Luna, Ángel David García, Francisco Solís, Manuel Casal y María José Linares
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba y Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

En 1964 Davies y cols. describieron por primera vez una infección en humanos atribuible a *Prototheca* spp. Desde entonces se han publicado numerosos casos de prototecosis cutánea, subcutánea y más raramente infección sistémica.

Tras una revisión de la literatura, no se encontró ningún estudio que nos reportara información de la sensibilidad de *Prototheca wickerhamii* frente a voriconazol. En nuestro trabajo un total de 104 cepas de *P. wickerhamii* y dos cepas control, fueron testadas frente a voriconazol, empleando el sistema colorimétrico Sensititre YeastOne y el método de referencia del NCCLS M27-A2. Los diferentes aislados fueron identificados mediante métodos de referencia y el estudio de sensibilidad mediante ambas técnicas se realizó siguiendo las normas del fabricante en el caso de Sensititre YeastOne y normas del NCCLS para el método de referencia.

Se comprobó que voriconazol presenta una gran actividad frente a *P. wickerhamii*, siendo la CMI en el 90% de los aislados $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. La relación entre las CMI₅₀ obtenidas con Sensititre y el método de referencia NCCLS fue del 100% ± 2 log₂ de dilución. En conclusión, voriconazol se ofrece como alternativa en el tratamiento de las infecciones producidas por *Prototheca* spp. y su eficacia debería ser establecida mediante la experiencia clínica.